

ANDRÉ LUIZ GONÇALVES

ESTUDOS COMPORTAMENTAIS DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:  
PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) EM ÁREA ENDÊMICA DE  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARANÁ,  
BRASIL

Tese apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor, pelo  
Programa de Pós-graduação em  
Microbiologia, Parasitologia e Patologia -  
área de concentração de Parasitologia,  
Setores de Ciências Biológicas e da  
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edilene  
Alcântara de Castro

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Nataly Araújo  
de Souza

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Gonçalves, André Luiz

Estudos comportamentais de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Paraná, Brasil. / André Luiz Gonçalves. – Curitiba, 2014.

108 f.: il. ; 30cm.

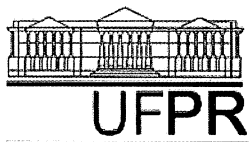
Orientadora: Edilene Alcântara de Castro

Co-orientadora: Nataly Araújo de Souza

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Leishmaniose. 2. Psychodidae. 3. Flebotomíneo. I. Título II. Castro, Edilene Alcântara de. III. Souza, Nataly Araújo de. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.2



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e nove dias do mês de novembro de dois mil e quatorze, às nove horas, na sala 129 do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora de defesa de tese de doutorado, de autoria do Pós-Graduando em Microbiologia, Parasitologia e Patologia ANDRÉ LUIZ GONÇALVES, sob o título "Estudos comportamentais de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, Brasil" sob a orientação e presidência da Profª. Drª Edilene Alcântara de Castro - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas/UFPR e a co-orientação da Drª. Nataly Araújo de Souza - Laboratório de Transmissores de Leishmanioses - FIOCRUZ. A Banca Examinadora constituída pelos professores: Profª. Drª. Rosângela Clara Paulino - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas/UFPR, Profª. Drª. Vanete Thomaz Soccol - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, Prof. Dr. Aguinaldo J. Nascimento - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR e o Dr. Vanderlei Campos da Silva - Laboratório de Transmissores de Leishmanioses - FIOCRUZ. A Banca Examinadora iniciou os trabalhos, com o candidato expondo oralmente seu trabalho por 60 (sessenta) minutos. Após, cada membro da banca examinadora fez uma arguição de durante 30 (trinta) minutos para o candidato. No final o candidato foi aprovado, segundo a avaliação da Banca Examinadora. Para a devida publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, da qual foi lavrada a presente ata que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 29 de novembro de 2014.

Profª. Drª. Edilene Alcântara de Castro - Presidente

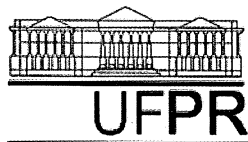
Drª. Nataly Araújo de Souza

Profª. Drª. Rosângela Clara Paulino

Profª. Drª. Vanete Thomaz Soccol

Prof. Dr. Aguinaldo J. Nascimento

Dr. Vanderlei Campos da Silva



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**"Estudos comportamentais de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, Brasil"**

**Por**

**ANDRÉ LUIZ GONÇALVES**

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Edilene Alcântara de Castro (presidente)**

**Dr<sup>ª</sup>. Nataly Araújo de Souza**

  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosângela Clara Paulino**

  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanete Thomaz Soccol**

  
**Prof. Dr. Aguinaldo J. Nascimento**

  
**Dr. Vanderlei Campos da Silva**

**Curitiba, 29 de novembro de 2014.**

O presente trabalho é dedicado à memória do médico sanitarista **Dr. Ennio Luz**, eminente professor e pesquisador, referência no estudo e combate das doenças infecciosas e parasitárias, e exemplo de sensibilidade perante os problemas do nosso povo.

## AGRADECIMENTOS

O agradecimento precípua pela realização deste trabalho é remetido aos seguintes professores, que pela convivência adquirida, além de valorosos pesquisadores, demonstraram serem pessoas excelentes: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz-Soccol, Dr<sup>a</sup>. Nataly Araújo de Souza e Prof. Dr. Ennio Luz (*in memoriam*).

À Prof<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro pela orientação, prestatividade e pela serenidade sempre presentes diante das situações difíceis.

À Prof<sup>a</sup>. Vanete Thomaz-Soccol, pelo exemplo, pela importante colaboração e pela intensidade com que ama a ciência.

À Dr<sup>a</sup>. Nataly Araújo de Souza, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses da Fundação Oswaldo Cruz (LTL/FIOCRUZ), pela co-orientação, pela acolhida junto ao seu laboratório por ocasião de treinamento lá realizado, e pela amizade resultante desta parceria.

Ao Prof. Ennio Luz, o grão-mestre, a quem devo grande parte dos conhecimentos adquiridos durante a vida acadêmica, além de uma bela amizade. A sua partida deixou uma lacuna irreparável.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), através do seu Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (PPGMPPat), e portanto, aos colegas e amigos que nos acompanharam desde os tempos de mestrado: Eduardo Luis Zardo, Fagner Salmazo Neiva, Francine Bontorin, Guilherme Garcia, Jaqueline Finau, Juliana Reis Burjack, Martha de Paula Soares Greca, Paulo Roberto Dantas Marangoni, Samarina de França Braga e Luciana Marques (Secretária do PPGMPPat). Também aos parceiros e amigos do Departamento de Patologia Básica e do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR: André Luiz de Almeida Melo, Lauro Novak (*in memoriam*), Ricardo Cancio Fendrich e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosângela Clara Paulino.

Pelos auxílios com os trabalhos de campo: Alceu Bisetto Jr., André Luiz de Almeida Melo, Sandra Mara Rodrigues da Silva Liebel e Tatiana Louise Gazda, bem como a Prof<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro, Prof. Ennio Luz e a Dr<sup>a</sup>. Cláudia Alves de Andrade-Coelho (do LTL/FIOCRUZ).

Ao Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento (do Departamento de Bioquímica da UFPR) e ao Dr. Vanderlei Campos da Silva (do LTL/FIOCRUZ), pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos membros componentes da banca examinadora desta tese, pelas valiosas contribuições para com o trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento dos nossos projetos de pesquisa.

Aos moradores de Adrianópolis, que apesar das adversidades causadas pela desigualdade e injustiça social, sempre nos receberam com muita alegria para que pudéssemos realizar as coletas de flebotomíneos em suas propriedades.

## RESUMO

Algumas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 são causadores da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Novo Mundo, incluindo o Brasil, e são transmitidos por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae: Phlebotominae). A LTA, endêmica no Paraná, tem o Vale do Rio Ribeira de Iguape como uma das suas principais áreas de transmissão neste estado. No município de Adrianópolis, a ocorrência da doença apresenta uma média de 11 casos em humanos por ano desde 2007, e a espécie patogênica é *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Em Epitácio Pessoa, localidade da área rural de Adrianópolis, ocorreram casos de LTA, constituindo-se portanto na área de estudo do presente trabalho. Com o objetivo de verificar a diversidade, a variação populacional por ecótopo, frequência horária e abundância dos flebotomíneos de acordo com as estações climáticas, procederam-se coletas destes vetores na área mencionada. Para tanto, armadilhas do tipo CDC foram instaladas no peridomicílio, domicílio e mata, entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, e a armadilha de Shannon foi utilizada entre a Primavera de 2012 e o Inverno de 2013. Uma parte dos flebotomíneos coletados foram dissecados para a pesquisa de infecção natural por *Leishmania*. Os flebotomíneos coletados foram identificados conforme as suas características morfológicas, e analisados estatisticamente por meio do Teste de qui-quadrado, Teste Z para duas proporções e foram calculados os índices de abundância ISA (Índice de Abundância Específico) e SISA (Índice de Abundância Específico Padronizado). *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* foi a espécie mais abundante, representando 99,11% dos flebotomíneos coletados com as armadilhas CDC e 99,34% dos coletados com armadilha de Shannon. Esteve presente em todos os ecótopos, com maior prevalência no peridomicílio, que por constituir um ambiente modificado pela ação humana é um ecótopo que permite a seleção desta espécie. Os flebotomíneos prevaleceram nas épocas quentes (Verão e Primavera), o que denota para estes períodos maior risco de transmissão de *L. (V.) braziliensis*. *Lutzomyia (N.) intermedia* apresentou um padrão de aumento da sua densidade até a metade da noite, para em seguida entrar em declínio. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* foi coletada praticando hematofagia na segunda metade da noite, quando esta espécie foi capturada em maior número. Apesar de nenhum dos flebotomíneos dissecados ter apresentado infecção pelo protozoário, é possível afirmar que *L. (N.) intermedia* e *L. (P.) fischeri* possam estar atuando como vetores na área estudada. A primeira, por apresentar densidade crescente no início da noite, no peridomicílio, e no domicílio na segunda metade, quando passaria a frequentar este ecótopo na busca de abrigo. A segunda, suspeita-se que possa ser a vetora secundária de *L. (V.) braziliensis*, pela baixa densidade mas com ocorrência no período final da noite e início da manhã, quando os trabalhadores rurais estão expostos no peridomicílio. Estes resultados são importantes para conhecimento do perfil epidemiológico da LTA na região e estabelecimento de medidas de controle.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana. Adrianópolis. *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. Frequência horária.



## ABSTRACT

Protozoa of the genus *Leishmania* Ross, 1903 causes American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the New World, including Brazil, and are transmitted by sand flies of the genus *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae: Phlebotominae). The ACL, endemic in the State of Paraná, has the Ribeira River Valley as one of its main areas of transmission. In the municipality of Adrianópolis, the occurrence of the disease has an average of 11 human cases per year, since 2007, caused specifically by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Epitácio Pessoa is a rural town nearby Adrianópolis where occurred ACL cases and corresponds to the study area of this work. Aiming to verify the diversity, population variation for ecotype, hourly frequency and population density of the sand flies according to climate stations, it were preceded up collection of these vectors in aforementioned area. For this study, CDC traps were installed in places outside the home, peridomicile and in wild areas, from October 2010 to January 2011, and the Shannon trap was used in the period between spring 2012 and winter 2013. Part of the sand flies were dissected for research of natural *Leishmania* infection. Sand flies collected were identified according to their morphological characteristics, and statistically analyzed using the chi-square test, Z test for two proportions and the abundance index ISA (Index of Species Abundance) and SISA (Standardized Index of Species Abundance). A *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* was the most prevalent species, with 99.11% of the sandflies collected with CDC traps and 99.34% with the Shannon trap. *Lutzomyia (N.) intermedia* was present in all ecotypes, with the highest prevalence in the peridomicile, which is an environment modified by human action and, for that, is an ecotype that allows the selection of this species. The sand flies prevailed in the warm seasons (spring and summer), denoting for these periods greater risk of transmission of *L. (V.) braziliensis*. *Lutzomyia (N.) intermedia* showed a pattern of increased population density until the middle of the night, going into decline afterwards. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* was collected practicing hematophagy in the second half of the night, when this species was captured in highest number. Although none of the sandflies dissected presented protozoan infection, it is possible to assert that *L. (N.) intermedia* and *L. (P.) fischeri* may be acting as vectors in the studied area. The first one, by presenting an increasing density in the early evening, in the peridomicile, and in the domicile in the second half of evening, when it would start at tending this ecotype in search for shelter. The latter, is suspected as secondary vector of *L. (V.) braziliensis*, due to the low density, but occurring at the end of the night and early morning, when farm workers are exposed in the peridomicile. These results are important for understanding the epidemiologic profile of ACL in the region and the establishment of control measures.

**Key Words:** American cutaneous leishmaniasis. Adrianópolis. *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. Hourly frequency.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** – Ciclo biológico das leishmânias: A infecção do flebotomíneo ocorre quando o mesmo ingere formas amastigotas durante o repasto sanguíneo, no hospedeiro reservatório. As amastigotas transformam-se em promastigotas, que colonizam e se multiplicam no intestino anterior, médio e/ou posterior do inseto. Promastigotas infectantes (metacíclicas) migram para o intestino anterior do flebotomíneo, e são transmitidas para outro hospedeiro mamífero pela regurgitação, durante nova tentativa de repasto. Estas promastigotas são opsonizadas e fagocitadas pelos macrófagos, onde resistem dentro de fagolisossomos, transformando-se em amastigotas. As amastigotas se multiplicam nas células infectadas por divisão binária. Fonte: Sacks & Noben-Trauth, 2002 (com modificações)..... 22
- FIGURA 2** – Formas clínicas das leishmanioses: (A) leishmaniose cutânea, (B) leishmaniose mucocutânea, (C) leishmaniose cutânea difusa e (D) leishmaniose visceral. Fonte: Bañuls *et al.*, 2007 ..... 24
- FIGURA 3** – Fases de desenvolvimento dos flebotomíneos: (A) ovos, (B) larva, (C) pupa e (D) fêmea adulta. Fonte: Dr<sup>a</sup>. Nataly Araújo de Souza, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/FIOCRUZ ..... 28
- FIGURA 4** – Incidência anual de leishmaniose visceral americana e leishmaniose tegumentar americana no Brasil, no período de 2000 a 2010. Fonte: Uliana, 2012 ..... 30
- FIGURA 5** – Localização da área de coleta de flebotomíneos na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, Paraná, Brasil. Fonte: o autor (2014) ..... 36
- FIGURA 6** – Aspectos da paisagem dos ambientes de coleta de flebotomíneos na localidade de Epitácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil: (A) galinheiro e (B) espaço peridomiciliar. Fonte: o autor (2012)..... 37
- FIGURA 7** – Ecótopos onde foram instaladas armadilhas CDC na localidade de Epitácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil: (A) domicílio, (B) peridomicílio e (C) mata. Fonte: o autor (2012) ..... 38
- FIGURA 8** - Material utilizado nas coletas, dissecções e preparação morfológica de flebotomíneos: lâminas e lamínulas (A), capturadores de Castro (B) e tubos Falcon (C). Fonte: o autor (2014) ..... 39
- FIGURA 9** – Armadilha de Shannon instalada no peridomicílio na localidade de Epitácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil. Fonte: o autor (2013) ..... 40

FIGURA 10 – Distribuição da espécie <i>Lutzomyia (Nissomyia) intermedia</i> nos três ecótopos na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2010 e janeiro de 2011 .....	44
FIGURA 11 – Variação populacional de <i>Lutzomyia (Nissomyia) intermedia</i> entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, no peridomicílio (galinheiro) na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil .....	46
FIGURA 12 – Frequência dos flebotomíneos, nos horários de sua maior densidade, em cada coleta realizada, com armadilha de Shannon, entre outubro de 2012 e agosto de 2013, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil.....	50
FIGURA 13 – Frequência horária dos exemplares de <i>Lutzomyia (Nissomyia) intermedia</i> coletados durante a Primavera, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no período de outubro a novembro de 2012 .....	53
FIGURA 14 – Frequência horária dos exemplares de <i>Lutzomyia (Nissomyia) intermedia</i> coletados durante o Verão, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no mês de março de 2013 .....	53
FIGURA 15 – Frequência horária dos exemplares de <i>Lutzomyia (Nissomyia) intermedia</i> coletados durante o Outono, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no período de abril a maio de 2013.....	54
FIGURA 16 – Frequência horária dos exemplares de <i>Lutzomyia (Nissomyia) intermedia</i> coletados durante o Inverno, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no período de julho a agosto de 2013 .....	54
FIGURA 17 – Frequência horária dos exemplares de <i>Lutzomyia migonei</i> coletados em cada estação, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no período de outubro de 2012 a agosto de 2013.....	55
FIGURA 18 – Esquema dos ciclos de transmissão de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil.....	70

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Espécies de leishmânias dermatrópicas causadoras de LTA, que ocorrem no Brasil, sua distribuição geográfica, seus potenciais vetores e referência bibliográfica.....	32
TABELA 2 – Datas, tipos de ecótopo e propriedades onde foram realizadas as coletas de flebotomíneos com armadilhas CDC na localidade de Eptácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil .....	38
TABELA 3 – Datas e estações do ano das coletas realizadas com armadilha de Shannon na localidade de Eptácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil .....	40
TABELA 4 – Espécies de flebotomíneos, por ecótopo, coletadas com armadilhas CDC entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil .....	43
TABELA 5 – Espécies de flebotomíneos coletadas mensalmente, por ecótopo, no período entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil.....	44
TABELA 6 – Comparações estatísticas aplicadas às amostras de <i>Lutzomyia (Nissomyia) intermedia</i> coletadas nos diferentes ecótopos, entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil.....	45
TABELA 7 – Espécies de flebotomíneos coletadas com armadilha CDC instalada no peridomicílio, referente ao período de outubro de 2010 a janeiro de 2011, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil .....	45
TABELA 8 – Comparações estatísticas aplicadas às amostras de <i>Lutzomyia (Nissomyia) intermedia</i> coletadas nos diferentes meses entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil ..	47
TABELA 9 – Espécies de flebotomíneos, por sexo, coletadas em cada estação, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre o período de outubro de 2012 e agosto de 2013.....	48
TABELA 10 – Índices ISA e SISA para as espécies de flebotomíneos coletadas durante a Primavera, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre o período de outubro e novembro de 2012.....	48

TABELA 11 – Índices ISA e SISA para as espécies de flebotomíneos coletadas durante o Verão, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no mês de março de 2013 ..... 49

TABELA 12 – Índices ISA e SISA para as espécies de flebotomíneos coletadas durante o Outono, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre o período de abril e maio de 2013 ..... 49

TABELA 13 – Índices ISA e SISA para as espécies de flebotomíneos coletadas durante o Inverno, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre o período de julho e agosto de 2013 ..... 50

TABELA 14 – Datas, estações do ano e temperaturas médias das coletas realizadas com armadilha de Shannon na localidade de Eptácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC – *Centers for diseases control*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ISA – Índice de abundância específico

Km – Kilômetro

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

m – Metro

ml – Mililitro

MLEE – Eletroforese de enzima multiloco

mm – Milímetro

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PSG – *Promastigote secretory gel*

RAPD – Amplificação randômica de DNA

SISA – Índice de abundância específico padronizado

SSCP – Polimorfismo de conformação de fita única

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
3.1 <i>Leishmania</i> e leishmanioses .....	20
3.2 Os flebotomíneos .....	24
3.3 Epidemiologia.....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1 Descrição da área de estudo.....	35
4.2 Análise da distribuição por ecótopo e variação populacional dos flebotomíneos.....	37
4.3 Pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> em flebotomíneos.....	38
4.4 Análise da frequência horária dos flebotomíneos por estações climáticas	39
4.5 Identificação taxonômica dos flebotomíneos.....	40
4.6 Análise estatística dos dados .....	41
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5.1 Distribuição por ecótopo e variação populacional dos flebotomíneos .....	43
5.2 Infecção natural por <i>Leishmania</i> .....	47
5.3 Atividade noturna dos flebotomíneos .....	47
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>73</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são endemias de vasta distribuição no Velho e no Novo Mundo, comprometendo, atualmente, cerca de 12 milhões de pessoas, em 98 países, abrangendo América Central, América do Sul, África, Índia, Ásia Oriental e Central e países europeus da Bacia do Mediterrâneo. Do total dos casos de leishmaniose visceral do mundo, 90% correspondem aos de ocorrência no Sudão, Bangladesh, Índia, Nepal e Brasil. O mesmo percentual dos casos de leishmaniose tegumentar ocorre no Brasil, Peru, Arábia Saudita, Síria, Irã e Afeganistão. Para ambas as infecções, estima-se a ocorrência de 1,2 milhão de novos casos e 20 a 30 mil mortes anuais (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2014).

Estas endemias são causadas por espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Metakinetoplastina: Trypanosomatida), que são capazes de parasitar o sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros mamíferos (TITUS *et al.*, 1993; DEDET *et al.*, 1999). Quando apresentam tropismo pela pele, estas espécies são causadoras da leishmaniose tegumentar, podendo se manifestar nas formas cutânea, mucocutânea ou cutânea difusa (SILVEIRA *et al.*, 2004; DUJARDIN, 2006). As espécies que apresentam viscerotropismo causam a forma visceral, com acometimento de diversos órgãos, principalmente o baço, fígado, medula óssea, linfonodos e mucosa intestinal (GUERIN *et al.*, 2002; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Os protozoários são transmitidos para os animais vertebrados mediante a alimentação sanguínea realizada nestes, pelas fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Nas Américas, os flebotomíneos transmissores das leishmânias pertencem ao gênero *Lutzomyia* França, 1924 (SHAW & LAINSON, 1987; YOUNG & DUNCAN, 1994). A transmissão ocorre quando as formas flageladas do protozoário (promastigotas) desenvolvem-se no intestino dos flebotomíneos vetores, para depois, durante novo repasto de sangue, serem regurgitadas em outro hospedeiro vertebrado, no qual são fagocitadas pelos macrófagos e transformadas em formas amastigotas (BAÑULS *et al.*, 2007; HIDE *et al.*, 2007).



No Brasil, as leishmanioses estão em franca expansão geográfica, presentes em capitais federativas como: Fortaleza (Ceará), Natal (Rio Grande do Norte), São Luiz (Maranhão), Teresina (Piauí), Belo Horizonte (Minas Gerais), Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Palmas (Tocantins) e Rio de Janeiro (Rio de Janeiro), e na periferia de cidades de médio e grande porte como: Santarém (Pará), Montes Claros (Minas Gerais), Corumbá (Mato Grosso do Sul), Araçatuba (São Paulo) e São Borja (Rio Grande do Sul). Fazem parte da lista de doenças que compõem o Sistema de Doenças de Notificação Compulsória (BRASIL, 2006; 2007).

As principais espécies de leishmânias causadoras de leishmaniose tegumentar e que ocorrem no nosso país (leishmaniose tegumentar americana – LTA) são: *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, e *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954. Estas espécies têm como seus respectivos vetores: *Lutzomyia (Psychodopygus) wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971), *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), e *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (para *L. (V.) braziliensis*); *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* (Mangabeira, 1942) (para *L. (L.) amazonensis*) e *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* (Mangabeira, 1942), *Lutzomyia (Nyssomyia) anduzei* (Rozeboom, 1942) e *L. (N.) whitmani* (para *L. (V.) guyanensis*). A leishmaniose visceral é causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 (GRIMALDI & TESH, 1993; ASHFORD *et al.*, 2010). A espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é incriminada pela transmissão de *L. (L.) infantum* (DEANE & DEANE, 1962; RANGEL & LAINSON, 2003).

Cada uma destas espécies de leishmânia está relacionada com diferentes padrões epidemiológicos, em que estão implicados distintos vetores e reservatórios (PETERSON & SHAW, 2003; ROQUE & JANSEN, 2014). A espécie *L. (V.) braziliensis* é responsável pela maior parte dos casos de LTA no Brasil, estando distribuída por todo o país, e com importantes áreas de transmissão na região Sudeste, nos estados de São Paulo (TOLEZANO, 1994), Rio de Janeiro (BUSTAMANTE *et al.*, 2009), Espírito Santo (FALQUETO *et al.*, 2003) e Minas Gerais (MARCELINO *et al.*, 2011). Na região Sul, o estado do Paraná é o que apresenta o maior número de casos de LTA, onde *L. (V.)*

*braziliensis* foi isolada de animais e seres humanos de áreas endêmicas nas regiões norte, central e no Vale do Rio Ribeira (LUZ *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2002; 2005; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009).

Na região do Vale do Rio Ribeira, a população predominante de flebotomíneos pertence à espécie *L. (N.) intermedia*, e recai sobre a mesma a suspeita de atuar como vetor de *L. (V.) braziliensis* para os seres humanos e animais domésticos (DOMINGOS *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2005; GONÇALVES, 2010).

A compreensão da dinâmica de transmissão do parasito é regida pelo conhecimento dos diferentes aspectos da biologia dos insetos vetores. Entre as metodologias utilizadas para estudar estes aspectos, encontram-se as análises de variação sazonal (SOUZA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2013), análises da frequência horária destes insetos e das estações climáticas do ano (SOUZA *et al.*, 2005; GONZÁLEZ *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2012).

Estudos conduzidos na região Neotropical sugerem claramente a existência de padrões diferenciados de atividade horária e antropofilia das espécies de flebotomíneos: algumas demonstram um pico de atividade no crepúsculo vespertino, enquanto outras nas horas mais avançadas da noite (WILLIAMS, 1966; 1970; GOMES *et al.*, 1983; HASHIGUCHI *et al.*, 1985; MORRISON *et al.*, 1995; FELICIANGELI, 1997). Investigações desenvolvidas em várias regiões do Brasil têm discutido os ritmos de atividade de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani* (ARAÚJO-FILHO, 1979; GOMES *et al.*, 1983; RANGEL *et al.*, 1990; AZEVEDO & RANGEL, 1991; GALATI *et al.*, 1996; BARROS *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2005).

Neste estudo, considerando o potencial papel vetorial de *L. (N.) intermedia* na região do Vale do Ribeira, objetivou-se pesquisar esta espécie, no município paranaense de Adrianópolis, onde têm sido notificados em torno de 11 casos anuais de LTA desde 2007 (BRASIL, 2014). Esta investigação está sustentada em dois pontos principais: análise da variação, frequência e preferência dos flebotomíneos pelos ecótopos de captura, e a análise da frequência horária e antropofilia destes, nas quatro estações do ano.

Assim, investigações que procurem esclarecer os padrões comportamentais dos transmissores de *Leishmania* spp. são de fundamental

importância para o controle da LTA neste município, servindo como referência para outras áreas endêmicas do país com perfis epidemiológicos similares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os aspectos ecológicos de flebotomíneos, com enfoque na espécie *L. (N.) intermedia*, em Adrianópolis, região do Vale do Rio Ribeira, área endêmica de LTA no estado do Paraná, Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar quais espécies compõem a fauna flebotomínica na região durante os períodos estudados, bem como a sua abundância;

Verificar a variação populacional dos flebotomíneos em diferentes ecótopos da área estudada ao longo de quatro meses;

Investigar a frequência horária dos flebotomíneos na região;

Estudar a flutuação da fauna flebotomínica na área acima mencionada, ao longo das quatro estações do ano;

Determinar a presença de *L. (V.) braziliensis* em flebotomíneos e os vetores do parasito da área estudada.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Leishmania* e leishmanioses

Protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 são parasitos heteroxenos de várias espécies de vertebrados, e que, para completarem o seu ciclo, necessitam de hospedeiros invertebrados da subfamília Phlebotominae (Diptera: Psychodidae), os flebotomíneos. O parasito tem duas formas: a amastigota, presente nos vertebrados, e a promastigota, nos hospedeiros invertebrados (ADLER & THEODOR, 1957; LAINSON & SHAW, 1987). Nas Américas, estes protozoários estão presentes desde a Península de Yucatán até o norte da Argentina e sul do Brasil, ocorrendo em 22 países (THOMAZ-SOCCOL, 1993). De acordo com Adl *et al.* (2005), as leishmânias possuem a seguinte classificação:

EXCAVATA Cavalier-Smith, 2002, emend. Simpson, 2003

\*EUGLENOZOA Cavalier-Smith, 1981, emend. Simpson, 1997

\*\*KINETOPLASTEA Honigberg, 1963

\*\*\*METAKINETOPLASTINA Vickerman in Moreira, Lopez-Garcia and Vickerman, 2004

\*\*\*\*TRYPANOSOMATIDA Kent, 1880, emend. Vickerman in Moreira, Lopez-Garcia and Vickerman, 2004

\*\*\*\*\**LEISHMANIA* Ross, 1903

O status taxonômico dos parasitos do gênero *Leishmania* tem sido foco de sucessivas pesquisas que envolveram desde a análise de caracteres clínicos (ADLER, 1964), morfológicos (WILLIAMS & COELHO, 1978), sorológicos (GRIMALDI *et al.*, 1987), a análise do desenvolvimento dos parasitos em animais de experimentação, nos meios de cultura e nos insetos vetores (LAINSON & SHAW, 1972; 1979), até a tipagem por meio de MLEE (Eletoforese de Enzima Multiloco) (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993a; CUPOLILLO *et al.*, 1995; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2000) e de marcadores moleculares diversos (ODDONE *et al.*, 2009; FRAGA *et al.*, 2013; MARCILI *et*

*al.*, 2014; CORTES *et al.*, 2014). Uma das propostas que logrou êxito entre os pesquisadores foi a de Lainson & Shaw (1987), que separaram os protozoários em dois subgêneros: *Leishmania* Saf'janova, 1982 e *Viannia* Lainson & Shaw, 1987. Os protozoários do subgênero *Leishmania* possuem as formas amastigotas maiores (3-6  $\mu\text{m}$ ) que as do subgênero *Viannia* (2-4  $\mu\text{m}$ ), além de crescerem com maior rapidez nos meios de cultura. As formas promastigotas do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se somente nas partes anterior e média do intestino dos insetos vetores, enquanto que as promastigotas do subgênero *Viannia* desenvolvem-se no intestino anterior, médio e posterior. A divisão em dois subgêneros foi confirmada posteriormente por estudos de MLEE (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993b; CUPOLILLO *et al.*, 1995) e biologia molecular (De BRUIJN & BARKER, 1992; VOLPINI *et al.*, 2004).

O ciclo de vida do gênero *Leishmania* está relacionado com o repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas dos flebotomíneos (Figura 1). Para que elas possam transmitir o protozoário, é preciso que façam uma refeição sanguínea em um hospedeiro vertebrado que seja reservatório, ou seja, aquele que mantém o ciclo do parasito na natureza, constituindo assim uma fonte de infecção (HERRER *et al.*, 1973). As formas amastigotas presentes no reservatório são então ingeridas pelo flebotomíneo juntamente com o sangue do animal, e quando atingem o intestino médio do inseto iniciam a transformação em formas promastigotas. Estas formas, após romperem a matriz peritrófica que envolve o bolo alimentar, colonizarão a região do intestino pela qual têm preferência, segundo a espécie/subgênero a que pertencem (LAINSON & SHAW, 1979; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Após intensa multiplicação, as promastigotas migram em direção ao intestino anterior do inseto, e secretam um gel (*promastigote secretory gel* – PSG) que bloqueia a porção anterior do intestino médio. Este bloqueio dificulta a sucção de sangue pelo flebotomíneo, e assim, quando realiza um segundo repasto, ele regurgita os protozoários juntamente com a saliva e o PSG diretamente no local da picada (STIERHOF *et al.*, 1999; ROGERS *et al.*, 2004).

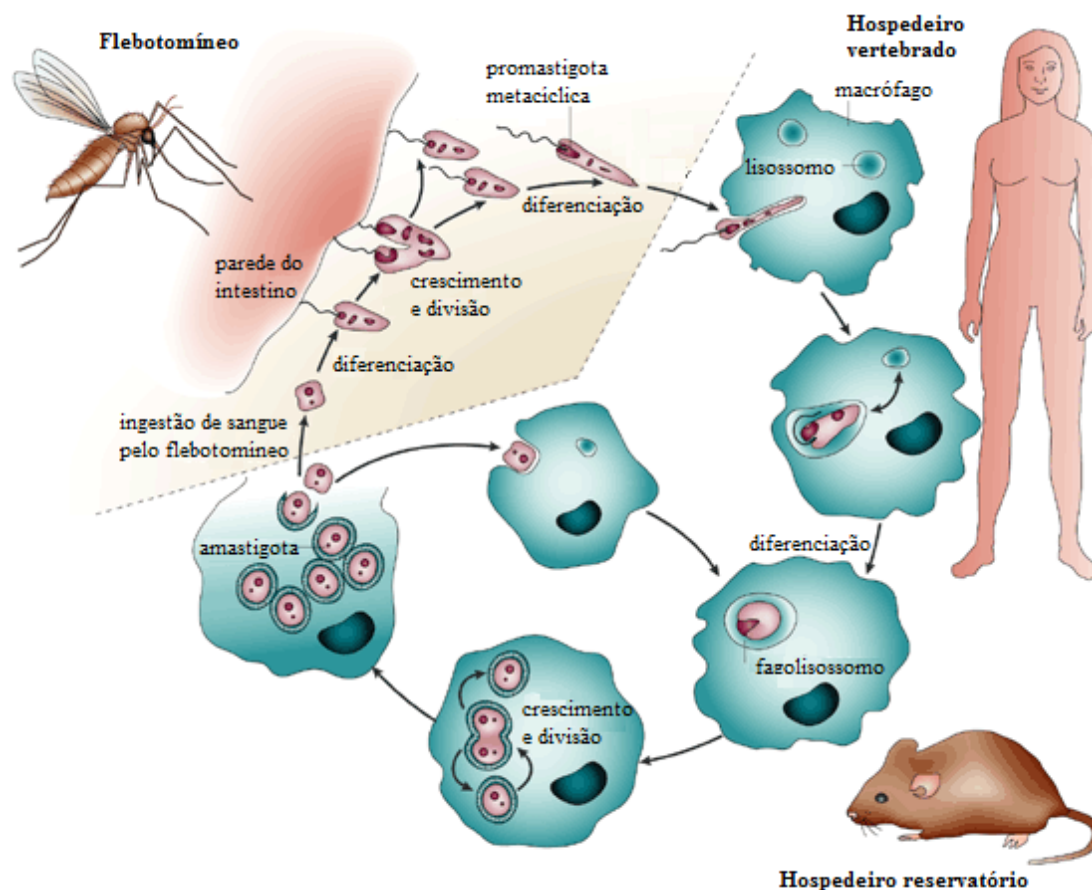


Figura 1: Ciclo biológico das leishmânias: A infecção do flebotomíneo ocorre quando o mesmo ingere formas amastigotas durante o repasto sanguíneo, no hospedeiro reservatório. As amastigotas transformam-se em promastigotas, que colonizam e se multiplicam no intestino anterior, médio e/ou posterior do inseto. Promastigotas infectantes (metacíclicas) migram para o intestino anterior do flebotomíneo, e são transmitidas para outro hospedeiro mamífero pela regurgitação, durante nova tentativa de repasto. Estas promastigotas são opsonizadas e fagocitadas pelos macrófagos, onde resistem dentro de fagolisossomos, transformando-se em amastigotas. As amastigotas se multiplicam nas células infectadas por divisão binária. Fonte: Sacks & Noben-Trauth, 2002 (com modificações)

As leishmanioses no Novo Mundo podem ser divididas em leishmaniose visceral americana (LVA) e leishmaniose tegumentar americana (LTA), com manifestações clínicas diversas, podendo evoluir desde a cura espontânea até a morte. (Figura 2). Enquanto que, nas Américas, a LVA é causada unicamente por *L. (L.) infantum*<sup>1</sup>, a LTA pode ser causada por várias espécies, cada qual relacionada com uma ou mais formas específicas de patologia humana (ASHFORD *et al.*, 2010):

<sup>1</sup> Sin.: *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937

- Leishmaniose cutânea: desenvolve-se com lesões únicas ou múltiplas, úlceras com bordas elevadas, base eritematosa, podendo ocorrer também formas disseminadas (HERWALDT, 1999) (Figura 2A). É causada no Brasil pelas seguintes espécies (GRIMALDI *et al.*, 1989; SILVEIRA *et al.*, 2002): *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* (principais), *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987, *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, Braga, de Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira, 1989, *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989 e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira, Ishikawa, Souza & Lainson, 2002.

- Leishmaniose mucocutânea: no Brasil, 3 a 5% dos casos por *L. (V.) braziliensis* são acometidos por lesões destrutivas nas mucosas das vias aéreas superiores, geralmente secundárias à lesão cutânea (Figura 2B) (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1988; REITHINGER *et al.*, 2007).

- Leishmaniose cutânea difusa: no Brasil, causada por *L. (L.) amazonensis*. Associada com pacientes imunocomprometidos, desenvolve-se com múltiplas lesões papulosas e nodulares não ulceradas, relacionada com forte anergia e resposta terapêutica pobre ou ausente (Figura 2C) (CONVIT *et al.*, 1993; AZULAY & AZULAY, 1995).

A LVA, também conhecida como calazar americano, é causada por *L. (L.) infantum*. Esta espécie é parasita das células do sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado e medula óssea, ocasionando febre irregular, acentuado emagrecimento e também hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia (Figura 2D) (DESJEUX, 2004; BAÑULS *et al.*, 2007).





Figura 2: Formas clínicas das leishmanioses: (A) leishmaniose cutânea, (B) leishmaniose mucocutânea, (C) leishmaniose cutânea difusa e (D) leishmaniose visceral. Fonte: Bañuls *et al.*, 2007

### 3.2 Os flebotomíneos

Os vetores de *Leishmania* pertencem à subfamília Phlebotominae. Das inúmeras propostas de classificação dos flebotomíneos americanos, destacam-se as de Forattini (1973), Martins *et al.* (1978), Artemiev (1991), Young & Duncan (1994) e Galati (2003). De acordo com Young & Duncan (1994), estes vetores possuem a seguinte classificação:

- Classe: Insecta Linné, 1758
- Ordem: Diptera Linné, 1758
- Família: Psychodidae Newman, 1834
- Subfamília: Phlebotominae Rondani, 1840
- Gênero: *Lutzomyia* França, 1924

No Velho Mundo, cabe ao gênero *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840 a responsabilidade pela transmissão de *Leishmania* (KILLICK-KENDRIK, 1999). Nas Américas, além do gênero *Lutzomyia*, a subfamília Phlebotominae alberga os gêneros *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1948, sem qualquer participação na transmissão do patógeno (YOUNG & DUNCAN, 1994).

Cerca de 476 espécies compõem o gênero *Lutzomyia*, distribuídas em toda região Neotropical e ao sul da região Neártica. Destas, em torno de 20 são vetoras confirmadas ou potenciais de *Leishmania* no Brasil (KILLICK-KENDRIK, 1990; YOUNG & DUNCAN, 1994; BERMÚDEZ, 2009).

Para sustentar a condição de espécie vetora, o flebotomíneo deve atender a alguns critérios: (1) permitir o encontro de formas promastigotas em fêmeas selvagens sem refeição sanguínea recente, (2) apresentar crescimento exuberante destas formas dentro do intestino, (3) apresentar atração por seres humanos e hospedeiros reservatórios, (4) mostrar forte associação ecológica, incluindo a sazonalidade, entre o flebotomíneo, seres humanos e reservatórios, (5) permitir a transmissão experimental após a infecção a partir de hospedeiros naturais ou modelo laboratorial equivalente, (6) demonstrar, por modelo matemático, e usando dados retrospectivos, que a espécie é essencial para manter a transmissão com ou sem o envolvimento de outros vetores, e (7) demonstrar, por modelo matemático, com base em um programa de controle planejado, que a incidência da doença diminui significativamente com a diminuição significativa da densidade do vetor específico (KILLICK-KENDRIK, 1990; BATES, 2007; ASHFORD *et al.*, 2010; READY, 2011; 2013).

Além da transmissão de *Leishmania*, flebotomíneos também estão implicados com a transmissão de outros microrganismos, como a bactéria *Bartonella bacilliformis* (causadora da doença de Carrión), arbovírus e outros

tripanosomatídeos (ANDERSON & NEUMAN, 1997; SHAW *et al.*, 2003; SOARES & TURCO, 2003; READY, 2013).

Os flebotomíneos, no Brasil, recebem diferentes denominações populares, conforme as regiões onde são encontrados: birigui, mosquito-palha, asa-dura, asa-branca, tatuquira, cangalha, cangalhinha, anjinho, ligeirinho, péla-égua, arrupiado. As características gerais listadas a seguir são as mais evidentes para descrever os flebotomíneos (FORATTINI, 1973):

- Geralmente não ultrapassam 5 mm de comprimento,
- Cor parda ou castanho clara,
- Corpo densamente cerdoso,
- Pernas longas e delgadas,
- Cabeça forma um ângulo de 90° com o tórax,
- Asas lanceoladas e hialinas,
- Vôo saltitante,
- Manutenção das asas abertas, mesmo em repouso, ao contrário dos outros dípteros,
- Criadouros terrestres, onde há acúmulo de matéria orgânica em decomposição,
- Criptozoários (vivem escondidos em abrigos úmidos, com pouca ou nenhuma luminosidade),
- Atividade crepuscular/noturna.

Os flebotomíneos são insetos holometábolos cujas formas imaturas se desenvolvem em ambiente úmido e alimentam-se de matéria orgânica em decomposição. Os adultos, criptozoários, possuem delgado exoesqueleto quitinoso, o que os tornam sensíveis às variações do ambiente (FORATTINI, 1973). Em flebotomíneos, ambos os sexos alimentam-se de sucos vegetais ou da secreção de afídeos (*honeydew*), substância rica em carboidratos (FORATTINI, 1973; KILLICK-KENDRICK, 1979; SOUZA *et al.*, 1995). A hematofagia em flebotomíneos está restrita às fêmeas, desempenhando um

papel importante na ovogênese, sendo que apenas estas possuem o aparelho bucal adaptado para sucção e perfuração (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Tais alimentações são essenciais: a primeira, rica em carboidratos, atua como fonte de energia, executando um papel importante na sua atividade de vôo, acasalamento e longevidade. A segunda, rica em proteínas, propicia a maturação dos oócitos. Essas dietas são tomadas por meio de duas formas de sucção: a primeira é obtida de substâncias doces disponíveis na superfície dos vários substratos encontrados na natureza, e a segunda é interna, por meio da perfuração de tecido animal ou vegetal (WATERHOUSE, 1957). Normalmente, em insetos hematófagos, o alimento ingerido segue dois caminhos. Sangue tomado por meio de perfuração da pele do hospedeiro entra diretamente para o intestino médio, enquanto que a alimentação açucarada é estocada no papo ou proventrículo (FRIEND & SMITH, 1975; FRIEND & STOFFOLANO, 1983; SOUZA, 1993).

Os flebotomíneos passam por um ciclo completo – metamorfose completa – com a presença de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3). A oviposição ocorre em torno de 5 dias após o repasto sanguíneo. Após 5 a 7 dias ocorre a eclosão dos ovos: as larvas apresentam quatro estádios, com duração aproximada de 20 dias. As pupas são claras, mas vão escurecendo conforme se aproxima a emergência do adulto. A duração da fase de pupa leva em torno de 10 dias. Depois de emergirem, as fêmeas já estão aptas para exercer a hematofagia (FORATTINI, 1973; RANGEL *et al.*, 1985; NASCIMENTO *et al.*, 2012).

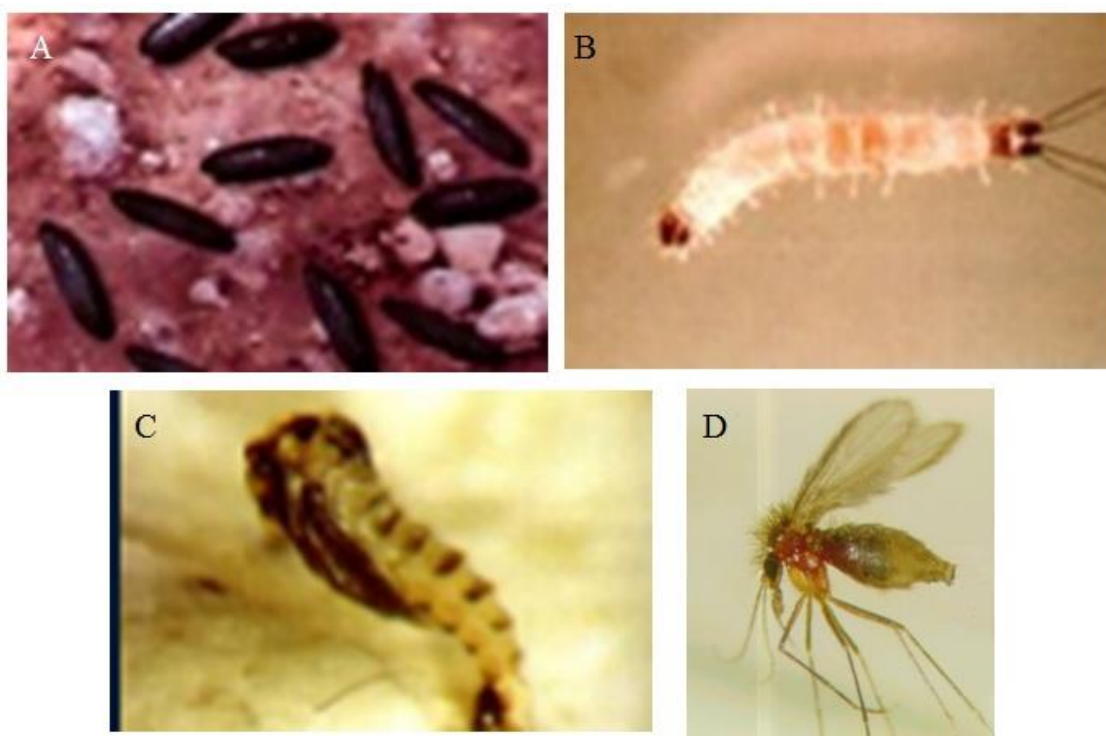


Figura 3: Fases de desenvolvimento dos flebotomíneos: (A) ovos, (B) larva, (C) pupa e (D) fêmea adulta. Fonte: Dr<sup>a</sup>. Nataly Araújo de Souza, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/FIOCRUZ

Os criadouros naturais dos flebotomíneos são terrestres e se caracterizam pela riqueza de matéria orgânica em decomposição: folhas, detritos, vegetais diversos, restos de artrópodes, fezes de animais e humus em geral. As larvas necessitam de ambiente úmido para o desenvolvimento (CHANLOTIS, 1967; VIEIRA *et al.*, 1999). Estes podem ser tocas de animais no solo, troncos de árvores, fendas de rochas, galinheiros, currais e chiqueiros (MANGABEIRA, 1969; FORATTINI, 1973; AGUIAR & VILELA, 1987).

### 3.3 Epidemiologia

As leishmanioses possuem distribuição mundial com presença registrada em 98 países, com prevalência global de 12 milhões de pessoas e uma população de 350 milhões sob risco de se infectar (DESJEUX, 2004; ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2014).

A forma visceral está presente em 77 países, com a ocorrência de 200 a 400.000 casos por ano (ASHFORD *et al.*, 2010; ALVAR *et al.*, 2012). No Brasil, apresenta alta taxa média de incidência anual (Figura 4), com cerca de 2 casos

por 100.000 habitantes e presença registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (BRASIL, 2006). Encontra-se em fase de contínua expansão para as áreas urbanas do país, o que, entre outros fatores, está relacionado com o comportamento do vetor, *L. (L.) longipalpis*, que possui uma notável capacidade de adaptação aos ambientes peridomésticos, domésticos e urbanizados (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; WERNECK, 2008; MICHALSKY *et al.*, 2009; BARRETO *et al.*, 2011). Em Corumbá e Ladário (Mato Grosso do Sul), *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) foi incriminada de participar na transmissão de *L. (L.) infantum*, com base em estudos que registraram a alta densidade e a infecção natural na espécie (GALATI *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 1998). Na Colômbia, *Lutzomyia (Lutzomyia) evansi* (Nunez-Tovar, 1924), pelos seus hábitos e por ter sido encontrada naturalmente infectada, também está sendo considerada como vetora de *L. (L.) infantum* (TRAVI *et al.*, 1990).

*Lutzomyia (L.) longipalpis* está distribuído em todas as regiões do país (RANGEL & VILELA, 2008; SOUZA *et al.*, 2009). No estado do Paraná, a presença deste flebotomíneo foi relatada recentemente, em Foz do Iguaçu (SANTOS *et al.*, 2012).

Nas áreas urbanas de LVA, existe a tendência de se apontar o cão doméstico - *Canis familiaris* - como reservatório de *L. (L.) infantum* (OLIVEIRA *et al.*, 2001; BRASIL, 2006). No entanto, este animal também pode desenvolver a doença quando infectado. Sugere-se que o canídeo silvestre *Cerdocyon thous* e *Didelphis* possam ter alguma participação no ciclo de *L. (L.) infantum* (DEANE & DEANE, 1955; SILVEIRA *et al.*, 1982; SHERLOCK, 1997).

Os animais reservatórios variam para cada espécie de *Leishmania*. Em relação às três principais espécies causadoras de LTA ocorrendo no Brasil, *L. (V.) guyanensis*, um parasito que tem distribuição restrita à região norte, e associado às florestas primárias, tem como principais reservatórios preguiças do gênero *Choloepus*, tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), os gambás (*Didelphis marsupialis*) e roedores do gênero *Proechimys* (ARIAS & NAIFF, 1981; GRIMALDI *et al.*, 1989). *Leishmania (L.) amazonensis*, de ampla distribuição na região amazônica, tem o seu ciclo mantido por roedores dos gêneros *Proechimys* e *Oryzomys*, *D. marsupialis* e outros marsupiais (DEDET *et al.*, 1985; LAINSON & SHAW, 1987). Pouco se sabe sobre os reservatórios

originais de *L. (V.) braziliensis*. Parasitos foram relatados em roedores dos gêneros *Akodon*, *Proechimys*, *Rattus*, *Oryzomys*, *Rhipidomys*, e no marsupial *Didelphis* (FORATTINI, 1960; LAINSON & SHAW, 1987; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; BASANO & CAMARGO, 2004; CASTRO *et al.*, 2007).

No período entre 1988 e 2007, 554.475 casos foram notificados, com uma média anual de 27.723 casos autóctones e uma incidência média de 17,3 casos por 100.000 habitantes (Figura 4). Durante os anos 1980, a LTA foi registrada em 19 estados e, em 2003, os casos autóctones confirmados ocorreram em 27. A incidência da doença diminuiu de 20,3 em 2000 para 10,5 por 10.000 habitantes em 2008 (ASHFORD *et al.*, 2010; ALVAR *et al.*, 2012). Das espécies causadoras de LTA, no Brasil, *L. (V.) braziliensis* responde pela maior parte dos casos, estando presente em todos os estados (LAINSON & SHAW, 1998; BRASIL, 2007).

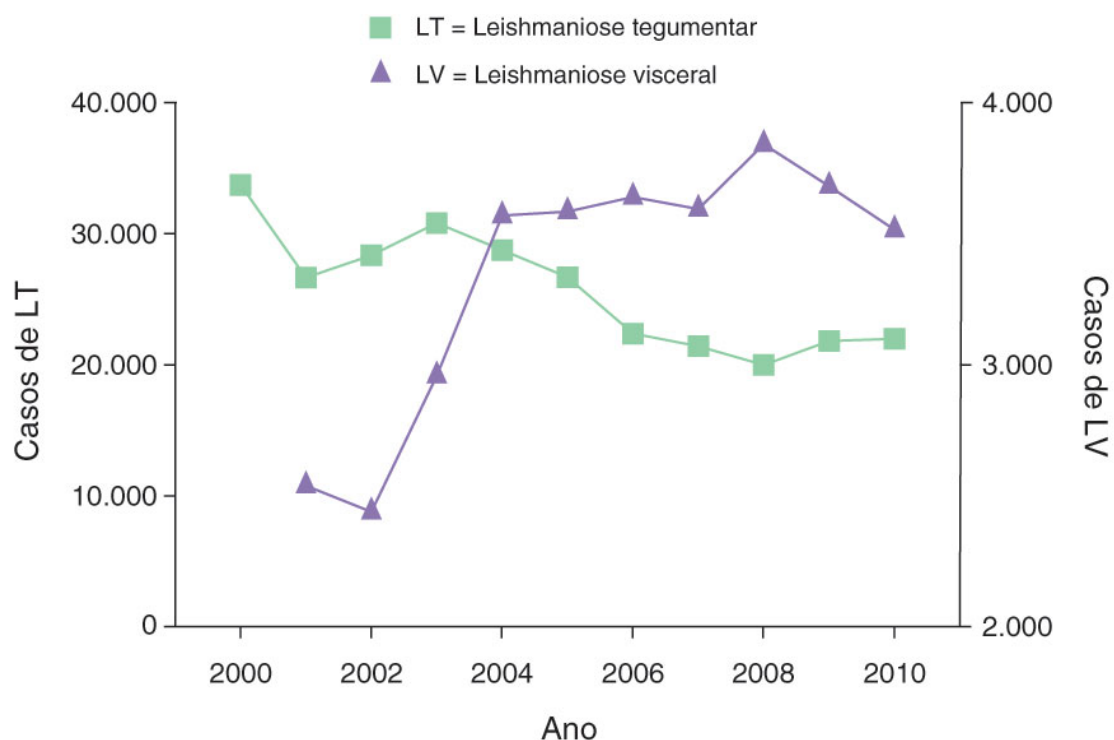


Figura 4: Incidência anual de leishmaniose visceral americana e leishmaniose tegumentar americana no Brasil, no período de 2000 a 2010. Fonte: Uliana, 2012

No Brasil, a LTA está relacionada com diferentes ciclos de transmissão nas diversas regiões, ocorrendo com considerável incidência em todo território nacional e, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, em 2003, pode-se assumir que a LTA está presente em todos os

Estados. Assim, podem-se classificar três padrões epidemiológicos (BRASIL, 2007):

- a) Silvestre – neste padrão, a transmissão ocorre em área de vegetação primária, e é fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres, que pode acometer o ser humano quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo a epizootia.
- b) Ocupacional e Lazer – este padrão de transmissão está associado a exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo.
- c) Rural e periurbano em áreas de colonização – este padrão está relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais.

A modalidade clássica da epidemiologia da LTA remete ao conceito de zoonose silvestre, no qual os seres humanos e animais domésticos são considerados hospedeiros acidentais do parasito após a sua incursão nas florestas (BRUMPT & PEDROSO, 1913; PESSÔA & BARRETO, 1948; PAVLOVSKY, 1965; LAINSON, 1983). No Brasil, o caráter endêmico da doença ficou evidenciado em áreas de colonizações antigas e recentes, em que as matas remanescentes ou residuais sucederam a floresta primária e onde ocorre a adaptação de algumas espécies de flebotomíneos aos ambientes peridomiciliar e domiciliar (FORATTINI *et al.*, 1976; GOMES *et al.*, 1990; GOMES & NEVES, 1998; MARTINS *et al.*, 2004). Surtos epidêmicos também são relatados, e a bacia amazônica, em razão da devastação florestal, destaca-se como uma importante área de transmissão (GOMES, 1992; CONFALONIERI *et al.*, 2014). Devido à extensão das atividades rurais, a LTA se espalhou para outras áreas, e atualmente também se caracteriza por ser uma doença periurbana (PASSOS *et al.*, 1993; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; ALVAR *et al.*, 2012).

No Brasil, foram identificadas sete espécies de *Leishmania* dermatrópicas responsáveis por infecções humanas, cujos ciclos de



transmissão estão associados a algumas espécies de flebotomíneos (Tabela 1).

—Tabela 1: Espécies de leishmânias dermatrópicas causadoras de LTA, que ocorrem no Brasil, sua distribuição geográfica, seus potenciais vetores e referência bibliográfica

Espécie	Distribuição Geográfica	Vetor	Referência
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> Vianna, 1911	Pará	* <i>Lutzomyia (Psychodopygus) wellcomei</i> (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971)	Lainson <i>et al.</i> (1973), Shaw <i>et al.</i> (1987), Ryan <i>et al.</i> (1987), Lainson & Shaw (1998), Shaw (2002)
	Pará	* <i>Lutzomyia (Psychodopygus) complexa</i> (Mangabeira, 1941)	Souza <i>et al.</i> (1996), Lainson & Shaw (1998), Shaw (2002)
	Bahia, Ceará, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul	* <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	Pessôa & Barretto (1948), Forattini <i>et al.</i> (1972), Hoch <i>et al.</i> (1986), Ryan <i>et al.</i> (1990), Azevedo <i>et al.</i> (1990), Queiróz <i>et al.</i> (1994), Lainson & Shaw (1998), Luz <i>et al.</i> (2000), Shaw (2002)
	Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Paraná	** <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> (Lutz & Neiva, 1912)	Aragão (1922), Forattini & Santos (1952), Forattini <i>et al.</i> (1972), Rangel <i>et al.</i> (1984;1992), Falqueto (1995), Lainson & Shaw (1998), Shaw (2002)
	Ceará, São Paulo	* <i>Lutzomyia migonei</i> (França, 1920)	Pessôa & Pestana (1940), Pessôa & Coutinho (1941), Pessôa & Barretto (1948), Forattini <i>et al.</i> (1972), Araújo-Filho (1979), Rangel <i>et al.</i> (1986), Azevedo <i>et al.</i> (1991), Lainson & Shaw (1998)
	São Paulo	** <i>Lutzomyia (Pintomyia) pessoai</i> (Coutinho & Barretto, 1940)	Pessôa & Coutinho (1940; 1941a), Pessôa & Barretto (1948), Forattini <i>et al.</i> (1972), Lainson & Shaw (1998), Shaw (2002)
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> Floch, 1954	Norte do Rio Amazonas	* <i>Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis</i> Ward & Fraiha, 1977	Arias & Freitas (1978), Lainson <i>et al.</i> (1979; 1981), Arias <i>et al.</i> (1985), Ryan <i>et al.</i> (1987), Lainson & Shaw (1998), Shaw (2002)
	Norte do Rio Amazonas	* <i>Lutzomyia (Nyssomyia) anduzei</i> (Rozeboom, 1942)	Lainson <i>et al.</i> (1976), Arias & Freitas (1977; 1978), Christensen <i>et al.</i> (1982), Arias <i>et al.</i> (1985), Ryan <i>et al.</i> (1987), Lainson & Shaw (1998)
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i> Lainson, Braga, de Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira, 1989	Sul do Rio Amazonas	* <i>L. (N.) whitmani</i>	Lainson <i>et al.</i> (1989), Naiff <i>et al.</i> (1991), Lainson & Shaw (1998), Shaw (2002)

<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i> Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987	Região Amazônica	* <i>Lutzomyia (Trichophoromyia) ubiquitalis</i> (Mangabeira, 1942)	Silveira <i>et al.</i> (1991)
<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> Lainson & Shaw, 1989	Pará e Amazonas	* <i>Lutzomyia (Psychodopygus) paraensis</i> (Costa Lima, 1941)	Arias <i>et al.</i> (1985), Lainson & Shaw (1998), Shaw (2002)
	Pará e Amazonas	* <i>Lutzomyia (Psychodopygus) ayrozai</i> (Barretto & Coutinho, 1940)	Arias <i>et al.</i> (1985), Lainson & Shaw (1990), Silveira <i>et al.</i> (1991), Lainson & Shaw (1998), Shaw (2002)
	Pará e Amazonas	* <i>Lutzomyia (Psychodopygus) squamiventris squamiventris</i> (Lutz & Neiva, 1912)	Arias <i>et al.</i> (1985), Lainson & Shaw (1998), Shaw (2002)
<i>Leishmania (Viannia) lindenbergi</i> Silveira, Ishikawa, Souza & Lainson, 2002	Pará	** <i>Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi</i> (Coutinho, 1939)	Silveira <i>et al.</i> (2002)
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> Lainson & Shaw, 1972	Região Norte e Nordeste do Brasil; Minas Gerais e São Paulo	* <i>Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata</i> (Mangabeira, 1942) * <i>Lutzomyia (Nyssomyia) olmeca nociva</i> Young & Arias, 1982	Lainson & Shaw (1968; 1998), Arias <i>et al.</i> (1985), Ryan <i>et al.</i> (1987), Shaw (2002)

Fonte: Andrade-Coelho, 2007 (com modificações). \*infecção natural, parasito isolado e caracterizado \*\*infecção natural, supostamente *L. (V.) braziliensis*.

Nas regiões Sudeste e Sul, algumas espécies de flebotomíneos com capacidade de adaptação ao ambiente domiciliar com intensa ação antrópica estão associadas ao ciclo de transmissão de *Leishmania* (GOMES, 1994; LAINSON *et al.*, 1994; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009). Neste contexto, destaca-se *L. (N.) intermedia*, sugerida como um dos principais vetores do protozoário ao homem (FORATTINI *et al.*, 1976; GOMES *et al.*, 1983; 1986; GOMES & GALATI, 1989; GOMES, 1992; RANGEL *et al.*, 1984; 1986; 1990; TANIGUCHI, *et al.* 1991; CASANOVA *et al.*, 1995; MENESES *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2005).

Contudo, outros flebotomíneos são arrolados como transmissores na cadeia epidemiológica da LTA, tais como: *L. (N.) whitmani*, *L. (P.) pessoai*, *L. migonei* e *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Pinto, 1926), por serem frequentadores do ambiente domiciliar e matas remanescentes (RANGEL *et al.*, 1986; GOMES & GALATI 1989; TOLEZANO, 1994; SOUZA *et al.*, 2001), sendo que tem sido conferido importante papel a *L. (N.) whitmani* no ciclo de transmissão nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná (MAYRINK, 1979; TANIGUCHI *et al.*, 1991; FALQUETO, 1995; LUZ *et al.*, 2000).

O Paraná constitui um dos estados brasileiros onde a LTA representa importante problema de saúde pública, com 98,7% dos casos da região sul (1980-2005) (BRASIL, 2007). Até o momento, três áreas de transmissão foram identificadas: o vale do Rio Ribeira, na região leste, a região norte e noroeste, e a região central (LUZ *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2007; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009). Em Adrianópolis, a ocorrência de LTA está relacionada com a entrada da população na mata, seja para exercer o trabalho rural ou para atividades de pesca e caça (CASTRO *et al.*, 2005), configurando um padrão epidemiológico ocupacional e de lazer. Na região do Vale do Rio Ribeira, as pesquisas realizadas em Cerro Azul e Adrianópolis também atestam a ampla dominância de *L. (N.) intermedia* e sua capacidade de adaptação aos ambientes modificados, pelo que recai sobre a mesma a suspeita do papel vetorial de *Leishmania* (CASTRO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2009; GONÇALVES, 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Descrição da área de estudo

O município de Adrianópolis está situado no estado do Paraná, região Sul do Brasil, a 24°39'26" Sul e 48°59'28" Oeste. Possui uma altitude de 250m, área de 1.341,334km<sup>2</sup> e uma população de 6.416 habitantes (IPARDES, 2014).

O município está localizado na bacia do Rio Ribeira de Iguape, que se estende da cumeeira da Serra de Paranapiacaba para o extremo sul do território paulista, e da Serra do Mar paranaense para a fronteira leste desse estado (SEVÁ FILHO & KALINOWSKI, 2012). Este rio possui uma extensão de 502km, dos quais 210 em território paranaense, desde a nascente até a foz do Rio Pardo, e 292km em território paulista, desde a foz do Pardo até a sua vazão no Atlântico (CAMARGO, 1998).

De acordo com a classificação de Köppen, o clima dominante na região é Cfa: clima subtropical, temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente acima de 22°C, com verões quentes e tendência de concentração das chuvas nesta estação, e sem estação seca definida. A precipitação anual é 1.200-1.300mm, distribuídos em todo o ano com 180 dias de chuva, concentrados principalmente nos meses de janeiro a março (IAPAR, 1994; CASTRO *et al.*, 2005).

A mata pluvial-tropical-subtropical do litoral e da Serra do Mar acompanha o Vale do Ribeira. É caracterizada por árvores de troncos elevados, palmáceas, lianas e epífitas, bem como pela umidade, calor e período vegetativo ininterrupto. Fazem parte desta flora variada as moráceas (figueiras - *Ficus* spp.), leguminosas (guapiruvu - *Schizolobium parahybum*, angico – *Piptadenia rigida*) e outras espécies, como cabriúva (*Myrocarpus* sp.) e coração de negro (*Machaerium stipitatum*) (MAACK, 2002).

A área pesquisada está situada na zona rural do município de Adrianópolis, na localidade de Epitácio Pessoa (Figura 5). Está situada numa depressão proveniente de um afloramento na forma de blocos e matações de rocha granítica. O substrato rochoso é constituído por uma pequena intrusão de biotita-granito, de cor cinza claro, granulação grossa e textura anisótropa. Aflora numa área de relevo suave ondulado e topograficamente rebaixado em

relação aos terrenos adjacentes, contendo várias áreas de pastagem (CPRM, 2014).

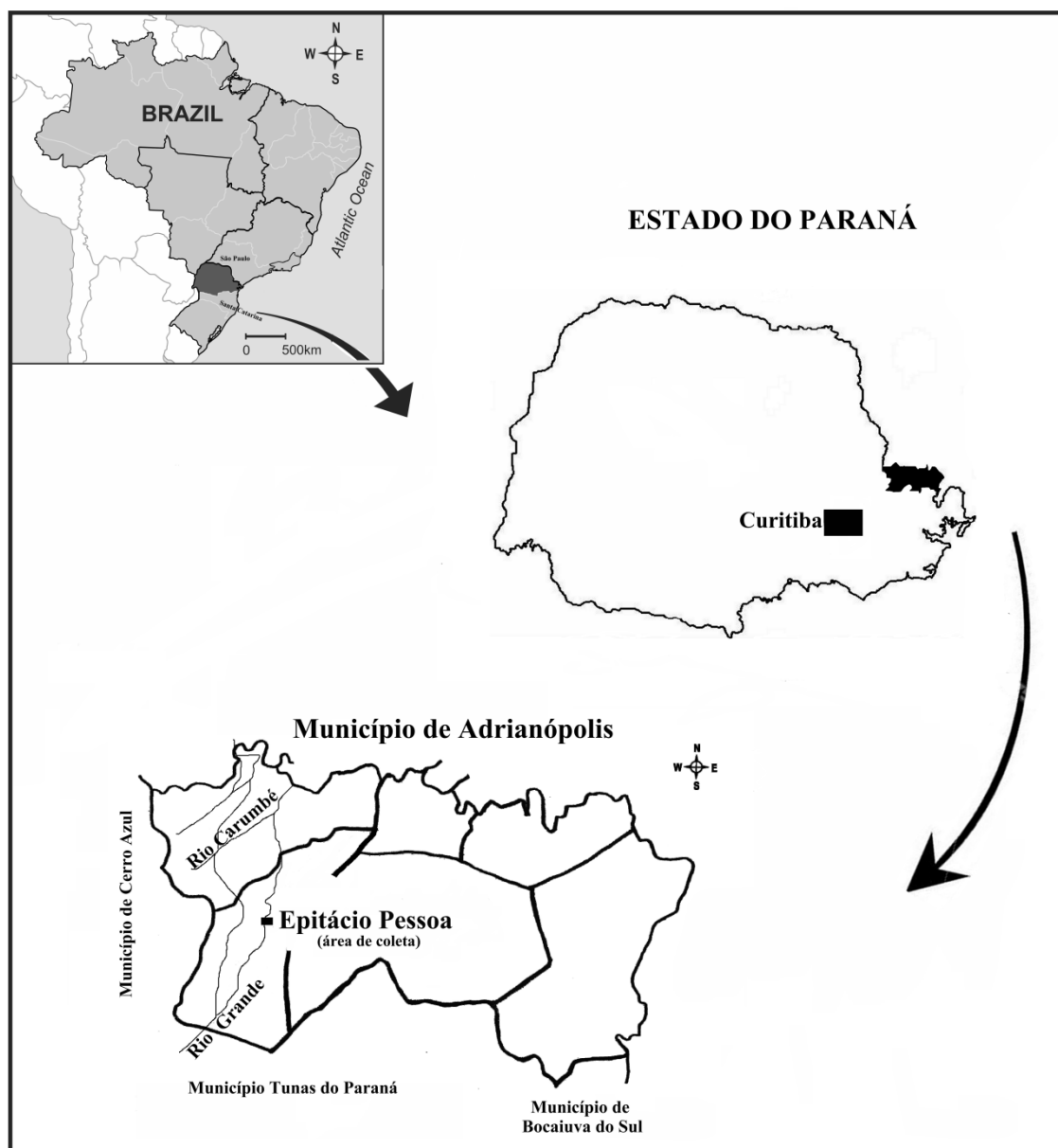


Figura 5: Localização da área de coleta de flebotomíneos na localidade de Epiácio Pessoa, município de Adrianópolis, Paraná, Brasil. Fonte: o autor (2014)

As coletas foram realizadas em três propriedades (denominadas “P1”, “P2” e “P3”), entrecortadas pelo Ribeirão Grande. Em duas destas propriedades (P1 e P3) são desenvolvidas as culturas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), banana (*Musa paradisiaca*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot* sp.) ou milho (*Zea mays*). Fragmentos desmatados da mata original estavam presentes juntamente com mata do tipo secundária. As três

possuíam galinheiros (Figura 6A), e animais domésticos como cães, suínos, equinos e galinhas comumente estavam soltos. Ainda em ambas, pelo menos um dos moradores foi diagnosticado com LTA. O peridomicílio apresentava-se com grande acúmulo de resíduos e matéria orgânica, o que formava uma paisagem característica (Figura 6B).



Figura 6: Aspectos da paisagem dos ambientes de coleta de flebotomíneos na localidade de Epitácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil: (A) galinheiro e (B) espaço peridomiciliar. Fonte: o autor (2012)

#### 4.2 Análise da distribuição por ecótopo e variação populacional dos flebotomíneos

Armadilhas luminosas do tipo CDC (*Centers for Diseases Control*) (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962) foram instaladas entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, no período compreendido entre as 18 e 06h, nos seguintes ecótopos: domicílio, peridomicílio e mata (Figura 7), em cinco pontos distintos (Tabela 2). A temperatura dos ambientes de coleta foi registrada quando do horário de instalação das armadilhas e da retirada das mesmas.



Figura 7: Ecótopos onde foram instaladas armadilhas CDC na localidade de Eptácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil: (A) domicílio, (B) peridomicílio e (C) mata. Fonte: o autor (2012)

Tabela 2: Datas, tipos de ecótopo e propriedades onde foram realizadas as coletas de flebotomíneos com armadilhas CDC na localidade de Eptácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil

Data da coleta	Ecótopo	Local
26/Outubro/2010	Peridomicílio (bananal)	P1
26/Outubro/2010	Domicílio	P2
26/Outubro/2010	Peridomicílio (galinheiro)	P2
26/Outubro/2010	Mata	P3
23/Novembro/2010	Peridomicílio (galinheiro)	P2
21/Dezembro/2010	Peridomicílio (galinheiro)	P2
21/Dezembro/2010	Mata	P3
24/Janeiro/2011	Peridomicílio (galinheiro)	P2
24/Janeiro/2011	Domicílio	P3

#### 4.3 Pesquisa de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos

Das fêmeas que chegaram ainda vivas no laboratório, coletadas com as armadilhas CDC referidas no item anterior, foram realizadas pesquisas da infecção natural do flebotomíneo por formas flageladas. Para tanto, as fêmeas capturadas, mortas com clorofórmio, foram colocadas em uma lâmina esterilizada com uma gota de solução salina (NaCl) a 0,9%, para então serem dissecadas com o auxílio de estiletes e de microscópio estereoscópico. Após



este procedimento, o trato digestório foi analisado em microscópio óptico na tentativa de se encontrar formas promastigotas e isolá-las. O restante do corpo foi separado para a identificação taxonômica, sendo montado em lâmina e lamínula (Figura 8A) (item 4.5).

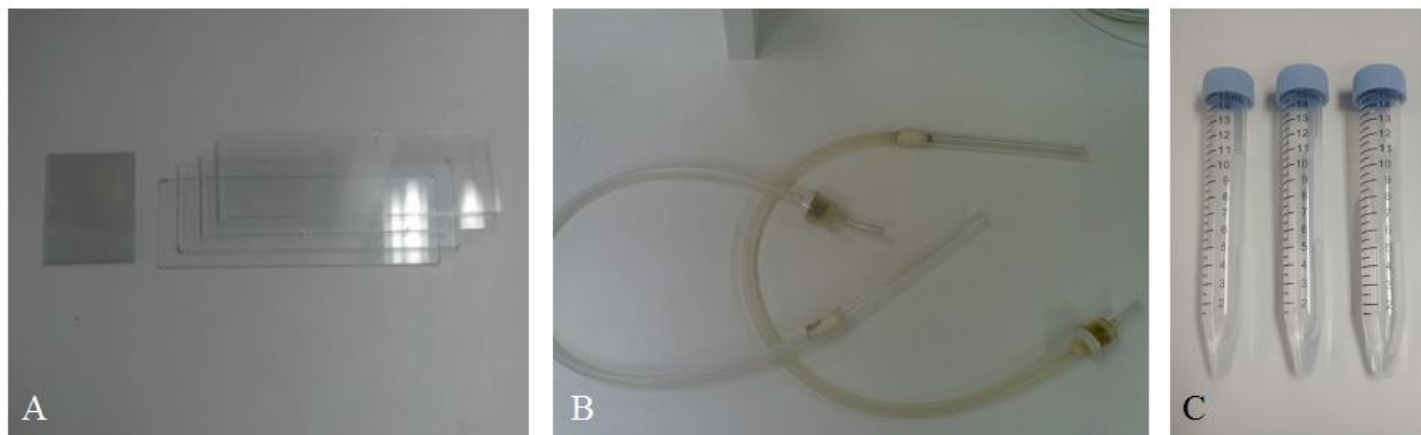


Figura 8: Material utilizado nas coletas, disseções e preparação morfológica de flebotomíneos: lâminas e lamínulas (A), capturadores de Castro (B) e tubos Falcon (C). Fonte: o autor (2014)

#### 4.4 Análise da frequência horária dos flebotomíneos por estações climáticas

A armadilha de Shannon (SHANNON, 1939), instalada na propriedade P3, foi utilizada por 8 noites (outubro e novembro de 2012, março, maio, junho, julho e agosto de 2013), no peridomicílio, de modo que cada estação climática do ano foi contemplada com duas coletas (Tabela 3). O local da coleta (Figura 9) é um pequeno espaço aberto, contornado por vegetação secundária, apresentando quantidade considerável de folhas e resíduos variados e onde eventualmente cães domésticos frequentavam o peridomicílio. Próximo ao ponto de coleta encontram-se um abrigo para equinos, uma residência, um fragmento de mata original e o Ribeirão Grande.

Os flebotomíneos foram coletados com auxílio do capturador de Castro (CASTRO, 1937) (Figura 8B) a cada hora conforme o horário da captura, entre 18 e 06h, e acondicionados em tubos do tipo Falcon de 15 ml contendo etanol a 70% (Figura 8C). Como isca luminosa, foi utilizada uma lamparina de luz branca. A temperatura do ambiente foi registrada a cada hora, e os insetos que vieram sugar os coletores foram capturados e identificados.



Tabela 3: Datas e estações do ano das coletas realizadas com armadilha de Shannon na localidade de Epitácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil

<b>Data da coleta</b>	<b>Estação climática</b>
16/Outubro/2012	Primavera
20/Novembro/2012	Primavera
05/Março/2013	Verão
18/Março/2013	Verão
25/Abril/2013	Outono
21/Maio/2013	Outono
02/Julho/2013	Inverno
20/Agosto/2013	Inverno



Figura 9: Armadilha de Shannon instalada no peridomicílio na localidade de Epitácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil. Fonte: o autor (2013)

#### 4.5 Identificação taxonômica dos flebotomíneos

Os flebotomíneos foram coletados e clarificados em hidróxido de potássio (KOH) a 20%, e após 24h visualizados em microscópio óptico e identificados de acordo com as características morfológicas. Nos machos foram avaliados os palpos e a terminália, e nas fêmeas foram avaliados palpos e as

espermatecas. As espécies foram identificadas usando-se a chave taxonômica de Forattini (1973) e classificadas conforme Young & Duncan (1994).

#### 4.6 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados obtidos com as armadilhas CDC foram realizadas com o uso do software Excel 2013 (Microsoft) com programação apropriada. Foi realizado o Teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para o número de representantes de cada espécie coletados com as armadilhas em função do seu ecótopo de origem, e em função da sua variação populacional ao longo dos 4 meses no peridomicílio (galinheiro da propriedade 2). O Teste Z para duas proporções - categorias mutuamente exclusivas (Teste bicaudal) – também foi aplicado sobre o número de exemplares de *L. (N.) intermedia*. As análises foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

A partir dos dados obtidos por meio da identificação dos espécimes coletados com a armadilha de Shannon, foram calculados os índices ISA (Índice de Abundância Específico) e SISA (Índice de Abundância Específico Padronizado).

O teste do índice ISA foi elaborado a partir da organização dos dados em uma tabela, com um número de linhas e de colunas de acordo com o tamanho das suas amostras. As linhas representam as espécies, e as colunas, as amostras, ou seja, o número de coletas realizadas durante o trabalho de pesquisa.

Após o término da classificação dos *ranks*, os índices ISA foram calculados a partir da fórmula:

$$ISA = \frac{(a + R_j)}{K}$$

Sendo:

*K*: Número de colunas da tabela (número de coletas).

*a*: Multiplicação do número de ausências de cada espécie em *K* por *c*.

*c*: Posição da espécie mais elevada (*rank*) na classificação mais um.

*R<sub>j</sub>*: Somatório das classificações de cada espécie.

Os limites máximo e mínimo deste índice foram determinados de acordo com o maior valor classificatório da distribuição, portanto estes limites variam em cada série de dados. Para evitar esta variação e padronizar o índice, este foi convertido para uma escala de valores entre 0 e 1 a partir do cálculo do SISA:

$$SISA = \frac{(c - ISA)}{(c - 1)}$$

Sendo:

*c*: Posição da espécie mais elevada na classificação mais um.

*ISA*: Índice de Abundância Específico.

A partir do cálculo do índice SISA, as espécies foram consideradas mais abundantes quando seus valores ficaram mais próximos a um, sendo então classificadas do maior para o menor valor de SISA. O resultado obtido forneceu informações sobre a abundância relativa das espécies capturadas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Distribuição por ecótopo e variação populacional dos flebotomíneos

Foram coletados 1.014 flebotomíneos, pertencentes às seguintes espécies: *L. (P.) pessoai* (02), *L. (P.) fischeri* (07) e *L. (N.) intermedia* (1.005) (Tabela 4).

Tabela 4: Espécies de flebotomíneos, por ecótopo, coletadas com armadilhas CDC entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil

Espécie	Domicílio	Peridomicílio	Mata	Total
<i>L. (N.) intermedia</i>	152	680	173	1.005
<i>L. (P.) fischeri</i>	1	4	2	7
<i>L. (P.) pessoai</i>	0	1	1	2
Total	153	685	176	1.014

Exemplares da espécie *L. (P.) fischeri* foram coletados em sua maioria no peridomicílio (57,14%), seguido da mata (28,57%) e do domicílio (14,28%). *Lutzomyia (P.) pessoai* teve 2 representantes coletados: 1 (50%) no peridomicílio e 1 (50%) na mata. A grande maioria dos espécimes, 99,11%, pertencia à espécie *L. (N.) intermedia*, que foi mais numerosa no peridomicílio (67,66%), seguido da mata (17,21%) e do domicílio (15,12%) (Figura 10).

O mês de maior abundância de flebotomíneos foi outubro, com 56,9% dos insetos coletados, seguido de dezembro (32,93%), novembro (7,29%) e janeiro (2,85%). A Tabela 5 mostra a quantidade de flebotomíneos, de cada espécie, que foi coletada mensalmente, entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, em relação aos ecótopos.

O Teste de qui-quadrado não demonstrou diferenças significantes sobre o número de representantes de cada espécie em função do seu ecótopo de origem ( $\chi^2=4,7247$ ; GL=4;  $p=0,3167$ ). O Teste Z para duas proporções, por sua vez, identificou diferenças entre as proporções de representantes da espécie *L. (N.) intermedia* coletados no peridomicílio em relação ao domicílio e daquele em relação à mata ( $p=0,0000$ ) (Tabela 6).

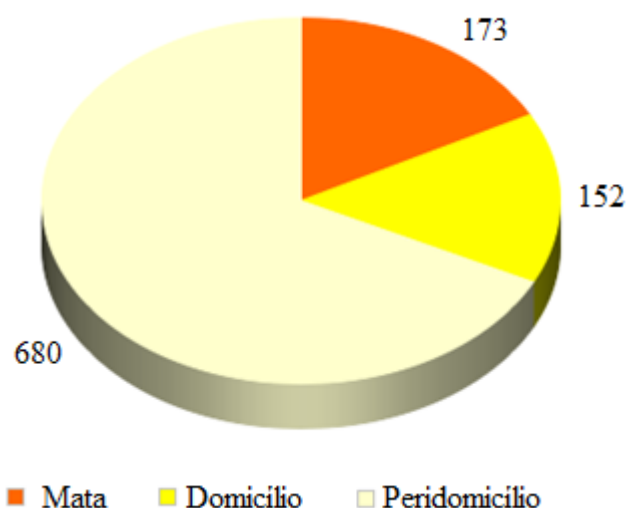


Figura 10: Distribuição da espécie *Lutzomyia (Nissomyia) intermedia* nos três ecótopos na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre outubro de 2010 e janeiro de 2011

Tabela 5: Espécies de flebotomíneos coletadas mensalmente, por ecótopo, no período entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil

Espécie	Ecótopo	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Total
<i>L. (N.) intermedia</i>	Domicílio	150	0	0	2	152
	Peridomicílio	301	73	279	27	680
	Mata	121	0	52	0	173
<i>L. (P.) fischeri</i>	Domicílio	1	0	0	0	1
	Peridomicílio	1	1	2	0	4
	Mata	2	0	0	0	2
<i>L. (P.) pessoai</i>	Domicílio	0	0	0	0	0
	Peridomicílio	0	0	1	0	1
	Mata	1	0	0	0	1
Total		577	74	334	29	1.014

Tabela 6: Comparações estatísticas aplicadas às amostras de *Lutzomyia (Nissomyia) intermedia* coletadas nos diferentes ecótopos, entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil

	Domicílio	Domicílio	Peridomicílio
	x	x	x
	Peridomicílio*	Mata	Mata*
Teste Z	4,919	1,596	6,685
Valor-p	0,0000	0,1105	0,0000

\* - Teste Z para duas proporções: diferenças estatisticamente significantes entre as proporções nos ecótopos (Z crítico bicaudal, 1,96)

Com as coletas realizadas com a armadilha CDC utilizada no peridomicílio da propriedade 2 (galinheiro), foi possível capturar 625 flebotomíneos (Tabela 7). No mês de dezembro obteve-se a maior densidade de flebotomíneos (282), seguido de outubro (242) e novembro (74). Janeiro foi o mês em que foi capturado menor número de insetos neste ponto de coleta (27). As temperaturas médias nas datas das coletas de outubro, novembro, dezembro e janeiro foram de 21,8°C, 23,9°C, 24,6°C e 25,2°C, respectivamente. Os dados pluviométricos destas datas, gentilmente cedidos pelo Sistema Meteorológico do Paraná – SIMEPAR, através da estação de Cerro Azul (mais próxima de Adrianópolis), foram os seguintes: 0mm (outubro), 1,4mm (novembro), 0mm (dezembro) e 0,2mm (janeiro).

Tabela 7: Espécies de flebotomíneos coletadas com armadilha CDC instalada no peridomicílio, referente ao período de outubro de 2010 a janeiro de 2011, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil

Espécie	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Total
<i>L. (N.) intermedia</i>	241	73	279	27	620
<i>L. (P.) fischeri</i>	1	1	2	0	4
<i>L. (P.) pessoai</i>	0	0	1	0	1
Total	242	74	282	27	625

Por ter sido realizada durante os quatro meses, a coleta feita com a CDC instalada no galinheiro de P2 foi eleita para demonstrar a flutuação populacional de *L. (N.) intermedia* durante este período (Figura 11).

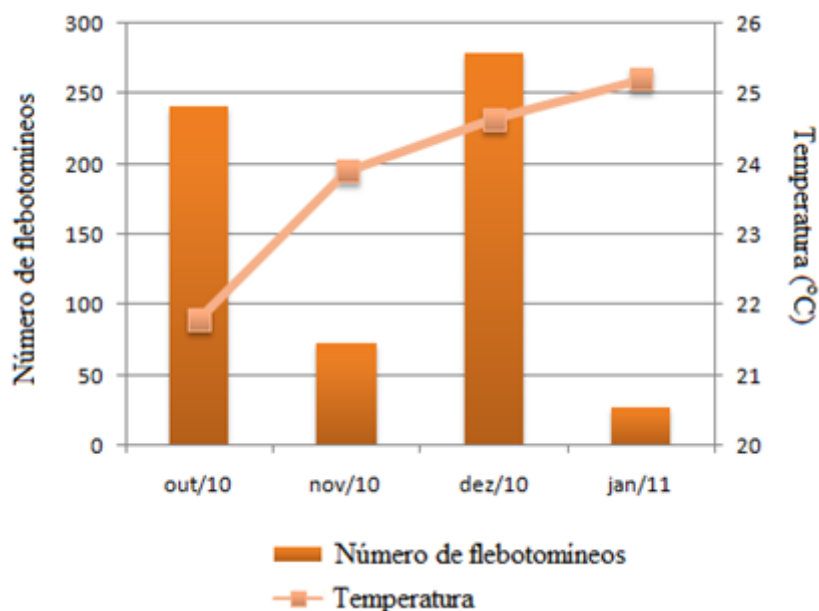


Figura 11: Variação populacional de *Lutzomyia (Nissomyia) intermedia* entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, no peridomicílio (galinheiro) na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil

O Teste de qui-quadrado não demonstrou diferenças significantes entre as proporções dos espécimes coletados entre outubro de 2010 e janeiro de 2011 ( $\chi^2=2,1994$ ; GL=6;  $p=0,9004$ ). Todavia, o Teste Z para duas proporções detectou diferenças entre as proporções de representantes da espécie *L. (N.) intermedia* coletados a cada mês, quando comparadas entre si ( $p<0,05$ ), exceto entre a proporção de espécimes coletados em outubro em relação a dezembro ( $p=0,0947$ ) (Tabela 8).

Tabela 8: Comparações estatísticas aplicadas às amostras de *Lutzomyia (Nissomyia) intermedia* coletadas nos diferentes meses entre outubro de 2010 e janeiro de 2011, localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil

	<b>Outubro</b>	<b>Outubro</b>	<b>Outubro</b>	<b>Novembro</b>	<b>Novembro</b>	<b>Dezembro</b>
	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>
	<b>Novembro*</b>	<b>Dezembro</b>	<b>Janeiro*</b>	<b>Dezembro*</b>	<b>Janeiro*</b>	<b>Janeiro*</b>
Teste Z	11,222	-1,671	-21,715	-13,540	5,180	25,395
Valor-p	0,0000	0,0947	0,0000	0,0000	2,21x10 <sup>-7</sup>	0,0000

\* - Teste Z para duas proporções: diferenças estatisticamente significantes entre as proporções nos ecótopos (Z crítico bicaudal, 1,96). Valores de Z negativos indicam observações menores que as esperadas.

## 5.2 Infecção natural por *Leishmania*

Nenhuma das fêmeas dos flebotomíneos apresentou formas promastigotas de *Leishmania* quando dissecadas.

## 5.3 Atividade noturna dos flebotomíneos

Com a armadilha de Shannon foram coletados 9.044 flebotomíneos, pertencentes às seguintes espécies: *L. (N.) intermedia* (99,34% dos flebotomíneos coletados), *L. migonei* (0,34%), *L. (P.) fischeri* (0,26%), *Lutzomyia firmatoi* (Barretto, Martins & Pellegrino, 1956) (0,02%), *L. (P.) pessoai* e *Lutzomyia (Evandromyia) edwardsi* (Mangabeira, 1941) (0,01% cada). A estação em que mais insetos foram coletados foi o Verão (63,82%), seguido da Primavera (13,14%), Inverno (11,68%) e Outono (11,34%) (Tabela 9). Prevalecendo em todas as coletas, *L. (N.) intermedia* foi a espécie mais abundante em todas as estações. *Lutzomyia migonei* foi a segunda espécie mais frequente, estando presente em todas as estações, enquanto que a terceira, *L. (P.) fischeri*, esteve presente em 3 estações (Primavera, Verão e Inverno). As demais espécies – *L. firmatoi*, *L. (P.) pessoai* e *L. (E.) edwardsi* – estiveram presentes em apenas uma estação: Inverno, Verão e Outono, respectivamente.



Tabela 9: Espécies de flebotomíneos, por sexo, coletadas em cada estação, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre o período de outubro de 2012 e agosto de 2013

Espécie	Primavera		Verão		Outono		Inverno		Total
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>L. (N.) intermedia</i>	360	800	3.202	2.555	339	676	272	781	8.985
<i>L. migonei</i>	10	2	3	5	3	7	1	0	31
<i>L. (P.) fischeri</i>	0	17	2	4	0	0	0	1	24
<i>L. firmatoi</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<i>L. (P.) pessoai</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>L. (E.) edwardsi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Total	1.189		5.772		1.026		1.057		9.044

As capturas realizadas no campo, divididas de acordo com as estações sazonais, foram realizadas com a intenção de se estimar os índices de abundância ISA e SISA. Assim, na Primavera (Tabela 10), as coletas renderam 1.189 exemplares, e *L. (N.) intermedia* apresentou o índice SISA de 1,0000, ou seja, esta espécie atingiu o pico desse índice que varia de 1 quando é a mais abundante a zero quando a espécie é menos encontrada. As outras duas espécies apresentaram índices próximos a zero, ficando *L. migonei* com SISA em 0,111111, e *L. (P.) fischeri* com SISA 0,166667.

Tabela 10: Índices ISA e SISA para as espécies de flebotomíneos coletadas durante a Primavera, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre o período de outubro e novembro de 2012

Espécie	Número de exemplares	ISA	SISA	Classificação
<i>L. (N.) intermedia</i>	1.160	1, 00000	1,000000	1
<i>L. migonei</i>	12	3,66667	0,111111	3
<i>L. (P.) fischeri</i>	17	3,50000	0,166667	2

O Verão (Tabela 11) foi a estação com maior número de indivíduos coletados, com 5.772 flebotomíneos capturados e com *L. (N.) intermedia* chegando novamente ao máximo exigido pelo índice SISA, que foi 1,000000. As outras espécies coletadas foram *L. migonei* com SISA 0,08333, *L. (P.) fischeri* com SISA 0,11806 e por último *L. (P.) pessoai*, com SISA em 0,02083.

Tabela 11: Índices ISA e SISA para as espécies de flebotomíneos coletadas durante o Verão, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no mês de março de 2013

Espécie	Número de exemplares	ISA	SISA	Classificação
<i>L. (N.) intermedia</i>	5.757	1, 00000	1,000000	1
<i>L. migonei</i>	8	3,75000	0,08333	3
<i>L. (P.) fischeri</i>	6	3,64583	0,11806	2
<i>L. (P.) pessoai</i>	1	3,93750	0,02083	4

O Outono (Tabela 12) teve um rendimento de 1.026 indivíduos. Novamente *L. (N.) intermedia* foi a espécie mais encontrada, com SISA 0,958333. As outras espécies coletadas no Outono foram *L. migonei*, com SISA 0,166667, e *L. (E.) edwardsi* com SISA 0,016667.

Tabela 12: Índices ISA e SISA para as espécies de flebotomíneos coletadas durante o Outono, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre o período de abril e maio de 2013

Espécie	Número de exemplares	ISA	SISA	Classificação
<i>L. (N.) intermedia</i>	1.015	1,10417	0,958333	1
<i>L. migonei</i>	10	3,08333	0,166667	2
<i>L. (E.) edwardsi</i>	1	3,45833	0,016667	3

No Inverno (Tabela 13) foi possível coletar uma quantidade de insetos quase semelhante à da estação anterior (Outono) e à da Primavera, com a captura de 1.057 exemplares. Dentre as espécies mais abundantes, *L. (N.) intermedia* foi a que compareceu em todas as coletas realizadas nesse período, com índice SISA de 1,0000. As outras espécies coletadas nessa estação sazonal foram *L. migonei*, com SISA de 0,020833 - o mesmo índice para as outras espécies, *L. firmatoi* e *L. (P.) fischeri*.

Tabela 13: Índices ISA e SISA para as espécies de flebotomíneos coletadas durante o Inverno, com armadilha de Shannon, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, entre o período de julho e agosto de 2013

Espécie	Número de exemplares	ISA	SISA	Classificação
<i>L. (N.) intermedia</i>	1.053	1,00000	1,00000	1
<i>L. migonei</i>	1	2,95833	0,020833	2
<i>L. firmatoi</i>	2	2,95833	0,020833	2
<i>L. (P.) fischeri</i>	1	2,95833	0,020833	2

Os horários de maior frequência dos flebotomíneos por cada estação estão expressos no gráfico da Figura 12, em que são mostrados os dois horários de maior densidade a cada coleta:

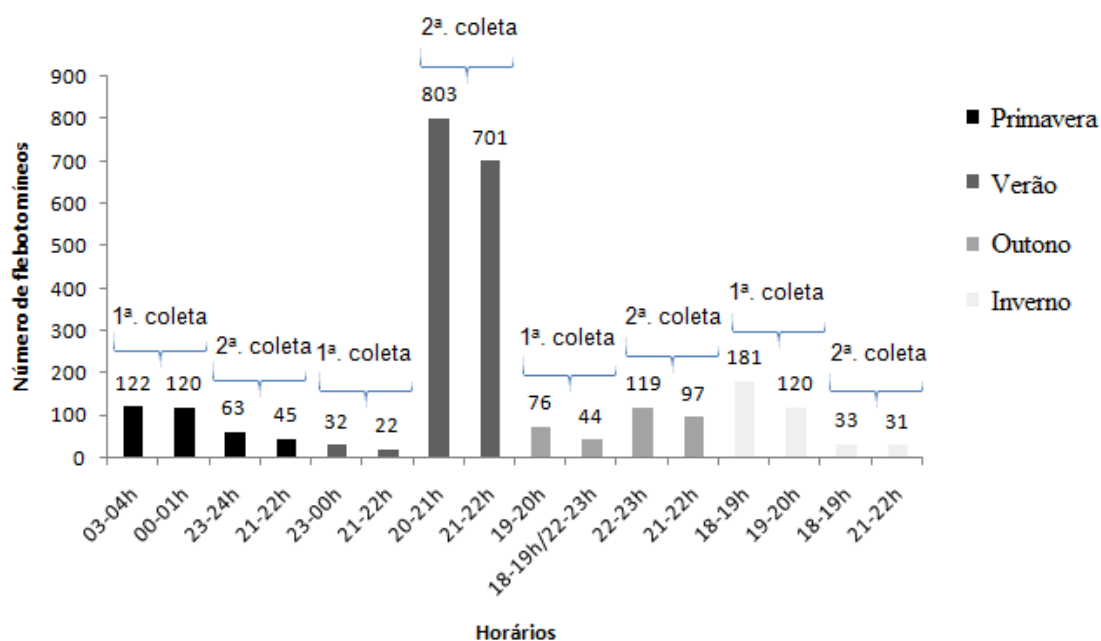


Figura 12: Frequência dos flebotomíneos, nos horários de sua maior densidade, em cada coleta realizada, com armadilha de Shannon, entre outubro de 2012 e agosto de 2013, na localidade de Eptácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil

A flutuação da ocorrência de *L. (N.) intermedia* com o decorrer da noite mostrou padrões semelhantes entre Primavera e Verão e entre o Outono e Inverno. Assim, na Primavera, esta espécie apresentou dois picos de maior abundância, o primeiro entre as 22 e 01h (para ambas as coletas) e o segundo entre 03 e 06h (para a primeira coleta, em que foi mais abundante). A espécie

se mostrou ativa entre 03 e 06h, com uma pequena diminuição entre 04 e 05h, voltando a subir entre 05 e 06h (Figura 13). A média da temperatura da noite da primeira coleta foi de 19,9°C, enquanto que a da segunda coleta foi de 19,6°C (Tabela 14). Na primeira coleta a temperatura variou de 23,4°C para o primeiro horário (18-19h) para 21,6°C até às 24h. A partir deste horário a temperatura diminuiu com o decorrer da noite até atingir 16,4°C no último horário (05-06h). A temperatura da noite na segunda coleta foi semelhante à primeira, que iniciou com 24,8°C até atingir 19,4°C às 24h, e a partir deste horário diminuiu até 17°C no último horário.

Tabela 14: Datas, estações do ano e temperaturas médias das coletas realizadas com armadilha de Shannon na localidade de Epitácio Pessoa, Adrianópolis, Paraná, Brasil

Data da coleta	Estação climática	Temperatura média (°C)
16/Outubro/2012	Primavera	19,9
20/Novembro/2012	Primavera	19,6
05/Março/2013	Verão	21,8
18/Março/2013	Verão	18,4
25/Abril/2013	Outono	17
21/Maio/2013	Outono	19,5
02/Julho/2013	Inverno	15
20/Agosto/2013	Inverno	14,8

No Verão, *L. (N.) intermedia* foi bem mais abundante durante a segunda coleta, que rendeu 5.485 espécimes a mais em relação à primeira, que apresentou pluviosidade na data em que foi realizada. Enquanto que na primeira coleta a espécie apresentou maior frequência entre 23 e 24h e entre 21 e 22h, na segunda ela apresentou dois picos de maior densidade, o primeiro, maior, entre 20 e 22h, e o segundo, entre 02 e 03h (Figura 14). A temperatura da noite na primeira coleta manteve-se estável, com uma média de 21,8°C. A noite da segunda coleta também teve a sua temperatura estável, com uma média de 18,4°C.

No Outono, *L. (N.) intermedia* foi mais coletada entre 18 e 20h e entre 20 e 23h na primeira coleta, enquanto que na segunda, que rendeu mais insetos,

os picos de maior frequência foram entre 21 e 23h e entre 02 e 03h (Figura 15). A média da temperatura na primeira coleta foi de 17°C, iniciando com 20,6°C até atingir 16,6°C na metade da noite. Da metade da noite em diante a temperatura manteve uma média de 16,2°C. Na segunda coleta, a média da temperatura foi de 19,5°C, com a temperatura em 21,2°C no primeiro horário até atingir 19,3°C às 24h. A partir deste horário, a temperatura manteve uma média de 19,2°C até o final da noite.

Na estação do Inverno, em ambas as coletas, *L. (N.) intermedia* apresentou maior densidade no início da noite, entre 18 e 20h na primeira coleta e entre 18 e 19h e entre 21 e 22h na segunda coleta (Figura 16). Ainda na primeira coleta, a espécie apresentou um segundo pico de frequência, entre 02 e 03h. A temperatura da noite da primeira coleta do Inverno teve 15°C de média, iniciando o primeiro horário com 16°C até atingir 14,9°C na sua metade, que a partir de então apresentou uma temperatura estável média de 14,8°C até o final. Na noite da segunda coleta, que apresentou maior densidade de flebotomíneos, a média de temperatura foi de 14,8°C. O primeiro horário apresentou 16,9°C, e a média da temperatura na primeira metade da noite foi de 15,3°C. A média da temperatura da segunda metade da noite foi de 14,3°C.

A segunda espécie mais prevalente, *L. migonei*, apresentou os maiores picos de frequência entre 23 e 01h, na Primavera, sendo capturada na primeira coleta (com picos secundários entre 21 e 22h, entre 03 e 04h e entre 05 e 06h), entre 22 e 23h no Verão, quando foi capturada na segunda coleta (com picos secundários entre 20 e 21h e entre 01 e 02h), entre 18 e 20h no Outono, sendo capturada nas duas coletas (com picos menores entre 21 e 22h), e entre 00 e 01h da segunda coleta do Inverno (Figura 17). A espécie foi mais numerosa na Primavera, seguida do Outono, Verão e Inverno.

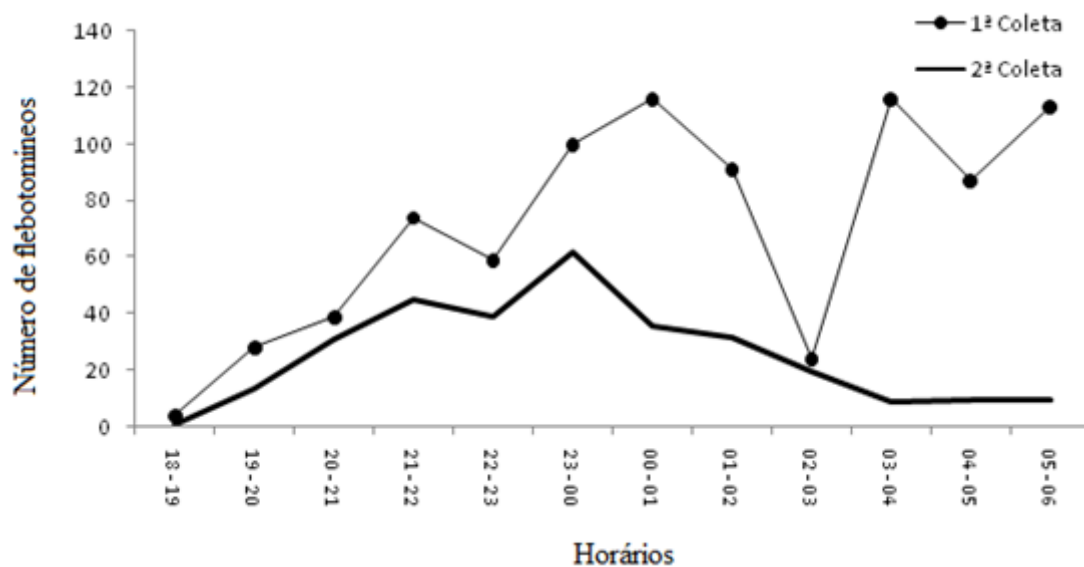


Figura 13: Frequência horária dos exemplares de *Lutzomyia (Nissomyia) intermedia* coletados durante a Primavera, com armadilha de Shannon, na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no período de outubro a novembro de 2012

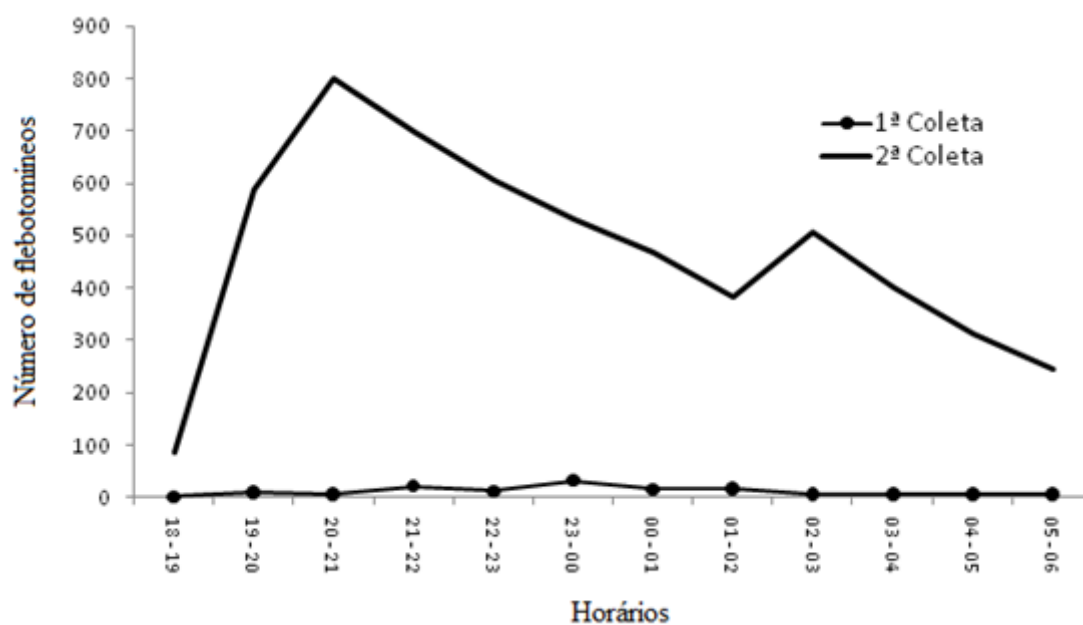


Figura 14: Frequência horária dos exemplares de *Lutzomyia (Nissomyia) intermedia* coletados durante o Verão, com armadilha de Shannon, na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no mês de março de 2013

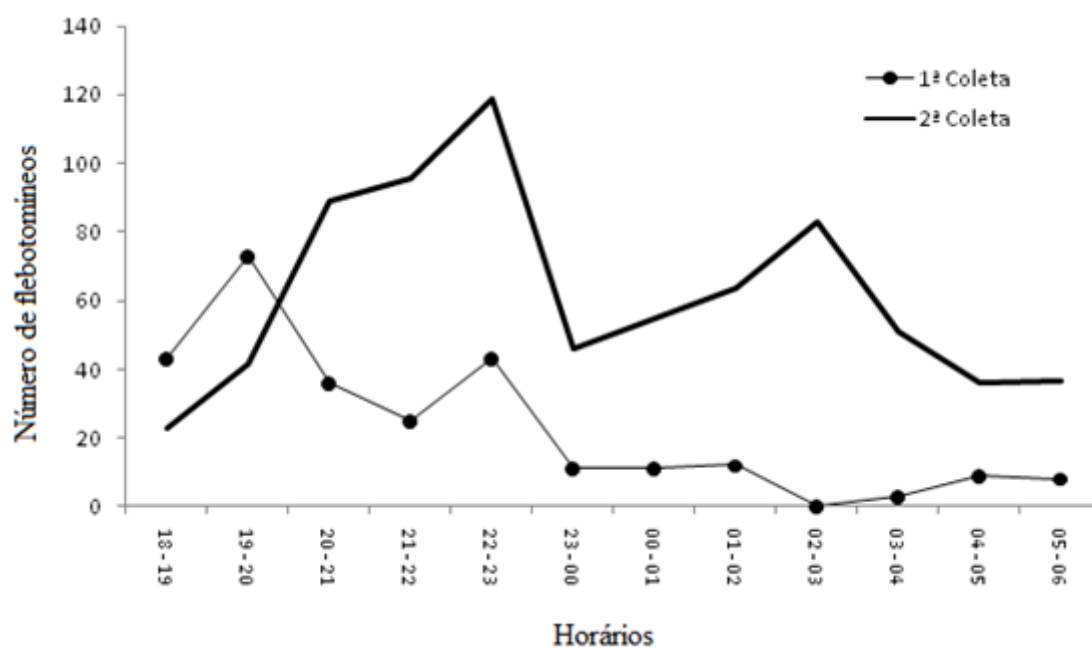


Figura 15: Frequência horária dos exemplares de *Lutzomyia (Nissomyia) intermedia* coletados durante o Outono, com armadilha de Shannon, na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no período de abril a maio de 2013

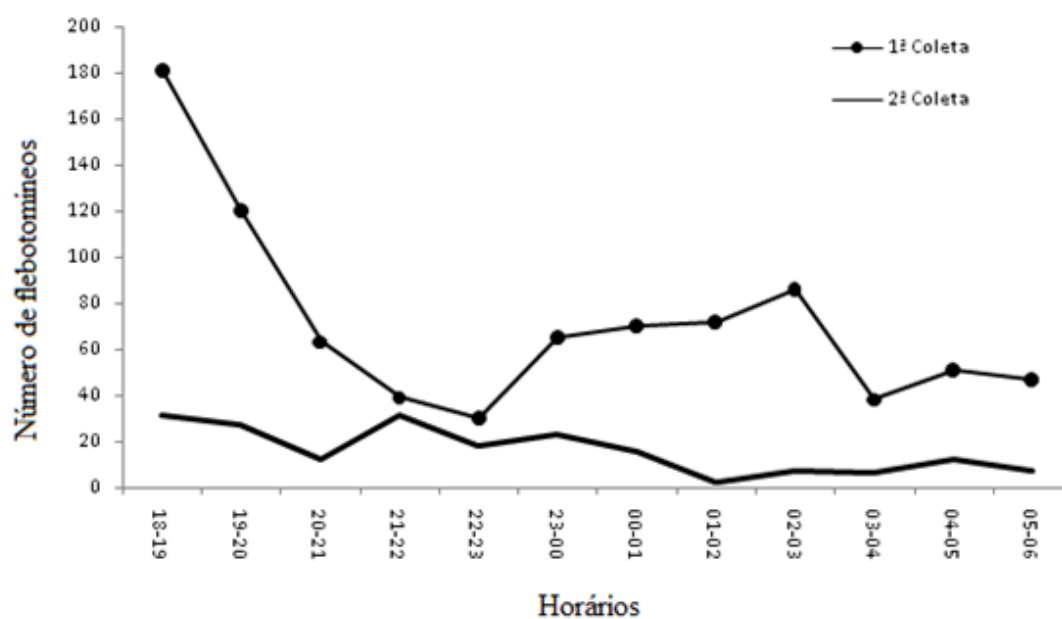


Figura 16: Frequência horária dos exemplares de *Lutzomyia (Nissomyia) intermedia* coletados durante o Inverno, com armadilha de Shannon, na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no período de julho a agosto de 2013

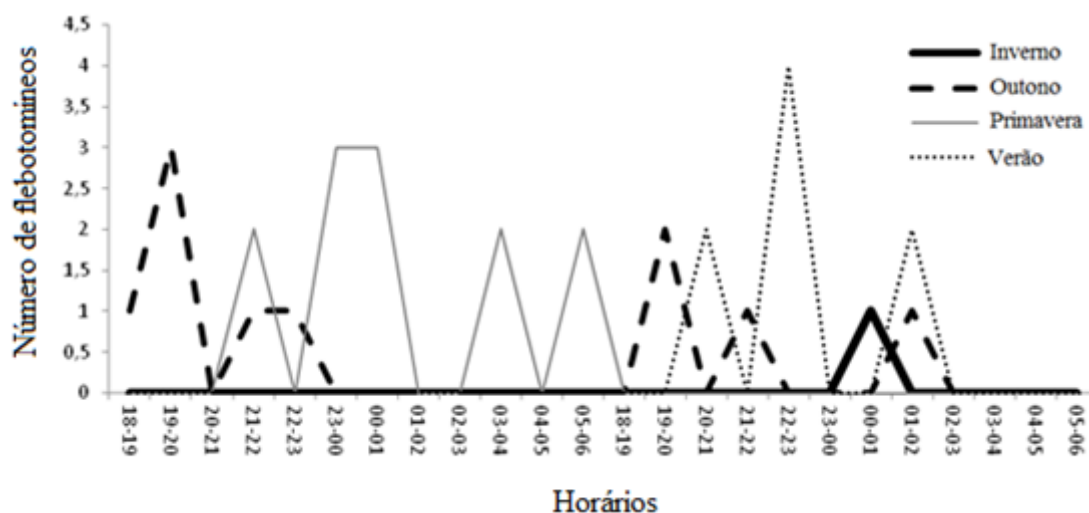


Figura 17: Frequência horária dos exemplares de *Lutzomyia migonei* coletados em cada estação, com armadilha de Shannon, na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil, no período de outubro de 2012 a agosto de 2013

A terceira espécie mais frequente, *L. (P.) fischeri*, teve maior abundância na Primavera, seguida do Verão e do Inverno. A primeira coleta da Primavera, que rendeu 15 dos 17 exemplares capturados nesta estação, apresentou maior densidade desta espécie entre 05 e 06h (com 5 espécimes coletados), entre 03 e 04h (com 4 espécimes) e entre 01 e 02h (com 3 espécimes). Os demais exemplares foram coletados entre 23 e 24h, 00 e 01h e entre 04 e 05h (1 espécime em cada horário). Na segunda coleta da Primavera, *L. (P.) fischeri* esteve presente com 1 representante entre 22 e 23h e entre 23 e 24h. No Verão, *L. (P.) fischeri* teve 1 representante capturado na primeira coleta (entre 04 e 05h) e 5 na segunda, sendo que nesta última os horários que apresentaram maior frequência foram entre 03 e 04h (com 2 espécimes) e entre 20 e 21h, 21 e 22h e 02 e 03h (1 espécime em cada). No Inverno, foi possível capturar 1 exemplar apenas, entre 04 e 05h na primeira coleta.

A quarta espécie mais frequente, *L. firmatoi*, esteve presente na segunda coleta do Inverno, entre 18 e 19h, com 2 representantes. *Lutzomyia (P.) pessoai* esteve presente no Verão, com 1 representante capturado entre 21 e 22h da segunda coleta, e *L. (E.) edwardsi* esteve presente no Outono, com 1 representante capturado entre 01 e 02h da segunda coleta.

Para a pesquisa de antropofilia, 2 exemplares da espécie *L. (P.) fischeri* foram capturados sugando os coletores, entre 01 e 02h da primeira coleta da Primavera.



## 6 DISCUSSÃO

Nos períodos pesquisados (outubro de 2010 a janeiro de 2011 e outubro de 2012 a agosto de 2013), foi possível identificar a presença de seis espécies compondo a fauna flebotomínia em Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis: *L. (N.) intermedia*, *L. migonei*, *L. (P.) fischeri*, *L. firmatoi*, *L. (P.) pessoai* e *L. (E.) edwardsi*. Em todo o estado do Paraná, esta fauna é composta de pelo menos 40 espécies (TEODORO *et al.*, 1999; CASTRO *et al.*, 2005; REINHOLD-CASTRO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; CRUZ *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2013). No estado, *L. (N.) intermedia* ocupa o primeiro lugar em abundância, seguida de *L. (N.) whitmani*, *L. migonei*, *L. firmatoi* e *L. (P.) fischeri* (SILVA *et al.*, 2008). Com exceção de *L. firmatoi*, as demais espécies são comprovadamente suspeitas e de estarem envolvidas com a transmissão de *L. (V.) braziliensis* no Brasil (LAINSON, 1983; GRIMALDI & TESH, 1993; ASHFORD *et al.*, 2010).

No presente estudo, *L. (N.) intermedia* prevaleceu sobre as demais espécies. Esta espécie de flebotomíneo foi descrita no início do século XX por Lutz & Neiva (1912), pelo encontro de exemplares no estado de Minas Gerais. É considerada por alguns autores como o complexo *L. (N.) intermedia sensu lato*, formado pelas espécies ou linhagens *L. (N.) intermedia sensu strictu* e *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto, 1926) (MARCONDES, 1996; 1997; ANDRADE-FILHO *et al.*, 2003; 2006). Possui distribuição em todo o território brasileiro, desde os estados das regiões Norte e Nordeste até o Rio Grande do Sul, estando presente ainda no sul da Bolívia, norte da Argentina e Paraguai (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2007).

A alta prevalência de *L. (N.) intermedia* é confirmada por outros estudos no Vale do Rio Ribeira, tanto no Paraná (CASTRO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; GONÇALVES, 2010) quanto em São Paulo (GOMES *et al.*, 1986; DOMINGOS *et al.*, 1998; TOLEZANO *et al.*, 2001; GALATI *et al.*, 2009; 2010; 2010a). Em Adrianópolis, Paraná, Castro *et al.* (2005) determinaram a prevalência de 97,58% desta espécie entre os flebotomíneos coletados, e Silva *et al.* (2008), Santos *et al.* (2009) e Gonçalves (2010) encontraram 98,7, 96,27 e 98,64% respectivamente, naquele município.

Esta prevalência é devida à alta capacidade de adaptação de *L. (N.) intermedia* a ambientes modificados, que formam uma paisagem característica no Vale do Ribeira, em que a mata do tipo secundária sucedeu após a influência antrópica (BARRETTO, 1943; GOMES *et al.*, 1986). Nestas áreas degradadas, esta espécie assume a condição de dominância quase absoluta perante as demais espécies (GOMES & GALATI, 1989).

Neste trabalho as coletas com as armadilhas CDC permitiram detectar a espécie *L. (N.) intermedia* em todos os ambientes de pesquisa e em grande quantidade, sendo mais frequente no peridomicílio, e com diferença estatisticamente significativa entre as proporções dos espécimes coletados neste ambiente em relação aos demais. Na área de estudo, este espaço apresenta grande quantidade de resíduos e matéria orgânica, além da presença de abrigos de animais domésticos. De acordo com Forattini (1953), *L. (N.) intermedia* é frequente nas áreas peridomiciliares, onde se encontram instalados os abrigos dos animais domésticos, como os chiqueiros, que favorecem a formação de criadouros para as formas imaturas.

No Paraná, em Prudentópolis, região central do estado, a espécie mais abundante também é *L. (N.) intermedia*, com alta densidade encontrada nos domicílios e abrigos de animais domésticos (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009; TEODORO *et al.*, 2011). Em Itambaracá, Cruz *et al.* (2012) realizaram levantamento em área urbana e periurbana, relatando a predominância de *L. (N.) intermedia* e a sua atração para o peridomicílio, demonstrando a capacidade de adaptação da espécie neste tipo de ambiente.

Na região norte do Paraná, pesquisas realizadas em diversas áreas rurais em municípios onde ocorre transmissão de *L. (V.) braziliensis*, apontam para o predomínio de *L. (N.) whitmani* sobre as demais espécies. Nestas áreas, a transmissão de *L. (V.) braziliensis* está relacionada com a existência de matas remanescentes e a ocupação humana e com a presença de galinheiros, chiqueiros, paióis e outros anexos próximos ao domicílio, favorecendo a manutenção dos criadouros dos flebotômíneos (LUZ *et al.*, 2000; MEMBRIVE *et al.*, 2004; LONARDONI *et al.*, 2006; TEODORO *et al.*, 2006; NEITZKE-ABREU *et al.*, 2012). Nesta região, *L. (N.) whitmani* foi encontrado infectado por *L. (V.) braziliensis*, no município de Cambira (LUZ *et al.*, 2000).

Em alguns municípios da região norte paranaense, *L. (N.) intermedia* é a espécie mais frequente (TEODORO & KUHL, 1997; CELLA *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2013). Em Cianorte e Doutor Camargo, Teodoro *et al.* (2001) verificaram a predominância de *L. (N.) whitmani* e *L. (N.) intermedia*, respectivamente, com número significativo de insetos coletados em abrigos de animais domésticos. Em Japurá, região noroeste, *L. (N.) intermedia* é a espécie dominante, seguida de *L. (N.) whitmani* (CELLA *et al.*, 2011), e em Bandeirantes, Melo *et al.* (2013) também relataram a predominância de *L. (N.) intermedia* sobre *L. (N.) whitmani*. Teodoro *et al.* (2003; 2006) sugerem que *L. (N.) intermedia* é mais frequente nas áreas de solos mais arenosos e bem drenados, enquanto *L. (N.) whitmani* prevalece nas áreas de latossolos vermelhos e vermelho-amarelos ou nitossolos, mais úmidos.

A influência das condições ambientais sobre a densidade das espécies de flebotomíneos também foi avaliada por vários estudos conduzidos no norte do Paraná. Numa propriedade rural de São Jorge do Ivaí, noroeste do estado, Teodoro & Kuhl (1997) observaram que a população destes vetores nos ambientes domiciliares diminuiu, após o deslocamento de um chiqueiro e a desobstrução de um porão onde repousavam animais domésticos. Em Terra Boa, Teodoro *et al.* (1999) realizaram coletas em área que passou por desmatamento e desinsetizações periódicas, observando grande redução da quantidade de flebotomíneos, e com *L. (N.) whitmani* ocupando a posição de dominância em relação a *L. migonei*. Reinhold-Castro *et al.* (2008), em Doutor Camargo, avaliaram medidas de controle de flebotomíneos, como desinsetização, solo livre de resíduos e umidade, e a atuação de galinhas (*Gallus gallus*) como barreira zooprofilática, e também verificaram redução do número de insetos, especialmente no caso das aves. O papel das galinhas como fonte de atração de flebotomíneos também já foi estudado no estado (TEODORO *et al.*, 2001; 2007).

A eficiência dos galinheiros como barreira zooprofilática é tema controverso entre diferentes autores. Rodrigues *et al.* (1999) relataram um aumento no risco de contrair a infecção por *L. (L.) infantum* em habitações com galinheiros no peridomicílio, e Alexander *et al.* (2002) relacionam a presença dos galinheiros como fator de atração dos mamíferos potenciais reservatórios de *Leishmania*. A presença dos galinheiros também poderia constituir fator de

atração dos próprios flebotomíneos ao ambiente domiciliar (GOMES *et al.*, 1980). Além disso, a grande prevalência destes insetos no ambiente peridomiciliar pode refletir o comportamento *lekking* dos flebotomíneos em ambientes artificiais, em que ocorre o agregamento de um grande número de machos nos locais visitados pelas fêmeas a fim de que ocorra o estabelecimento de territórios e acasalamento, sendo frequentemente estes locais os ambientes habitados pelos hospedeiros vertebrados, como os animais domésticos (QUINNELL & DYE, 1994; KILLICK-KENDRICK, 1999).

Em nosso trabalho, a presença dos flebotomíneos na mata e no domicílio também caracteriza estes ecótopos como ambientes em que pode ocorrer a transmissão de *Leishmania* (FORATTINI, 1953; GOMES *et al.*, 1980; DOMINGOS *et al.*, 1998; VIRGENS *et al.*, 2008). Aragão & Lima (1987) definem *L. (N.) intermedia* como uma espécie das florestas tropicais e subtropicais das encostas e de suas extensões. Teodoro *et al.* (1991), no município de Terra Boa, avaliaram a frequência de flebotomíneos em área de mata residual alterada, com *L. (N.) intermedia* sendo a segunda espécie mais frequente, com *L. (N.) whitmani* ocupando a primeira posição.

Ao longo do processo de adaptação a novos habitats, em função de alterações ambientais, algumas espécies de flebotomíneos no Brasil se adaptaram a novos cenários ecológicos, chegando ao ambiente domiciliar. No Sudeste do Brasil, ao longo dos anos, algumas das associações flebotomíneos-mamíferos-parasitos vêm sendo modificadas. Flebotomíneos, vetores primitivos, podem ter desaparecido ou se tornado tão incomuns que perderam efetivamente a função na transmissão dos parasitos, seu papel teria sido ocupado por outra espécie que teria se adaptado às novas condições ecológicas, e com algumas chegando ao ambiente domiciliar. Isso parece ser o caso, em graus variados, de *L. (P.) pessoai*, *L. (P.) fischeri*, *L. migonei*, *L. (N.) whitmani*, *L. (N.) intermedia* e *L. (L.) longipalpis* (SOUZA, 2003). As quatro primeiras estão, possivelmente, envolvidas na manutenção da infecção entre animais silvestres, ciclo que ainda persiste nos resíduos de florestas primárias degradadas ou secundárias (LAINSON, 1983). Destas seis espécies citadas, três parecem estar mais adaptadas ao ambiente peridoméstico: *L. (L.) longipalpis*, que participa da transmissão de *L. (L.) infantum*, *L. (N.) intermedia*, que parece ser o provável vetor domiciliado de *L. (V.) braziliensis*, e *L. (N.)*

*whitmani*, que é um importante transmissor deste parasito no Brasil, inclusive no Paraná (LAINSON, 1983; RANGEL, 1995; LUZ *et al.*, 2000; GONTIJO *et al.*, 2002; SOUZA, 2003).

O sucesso adaptativo de *L. (N.) intermedia* nos ambientes modificados, no Vale do Ribeira, está relacionado com o tempo de colonização humana nas áreas endêmicas. Silva & Gomes (2001) apontam para a natureza do perfil epidemiológico de transmissão de *Leishmania* na região, onde o estabelecimento da área endêmica é recente e coincide com o aparecimento de *L. (N.) intermedia* no ambiente rural. No estado do Paraná, a LTA passou a ser relatada no Vale do Ribeira somente a partir da década de 1950 (MIRANDA & SCHWEIDSON, 1955).

Existem evidências do aumento dos fatores de risco na transmissão das leishmanioses em muitas partes do mundo. Este aumento é resultado principalmente das drásticas mudanças no meio ambiente que estão associadas com o desenvolvimento econômico. Elas são causadas principalmente, por movimentos migratórios ocorridos nas últimas décadas, por meio de projetos de colonização e construção de rodovias, que têm resultado, na maioria das vezes, em modelos de ocupação desordenados aliados à destruição da cobertura vegetal. Como consequência dessas alterações ambientais, alguns mamíferos silvestres que atuam como reservatórios de *Leishmania* poderiam invadir áreas antrópicas, onde flebotomíneos com hábito alimentar eclético poderiam transmitir o parasito, presente nestes animais, para o homem (RANGEL & LAINSON, 2003; SOUZA, 2003).

No Vale do Ribeira paranaense, a obtenção de prata e ouro era realizada por meio da exploração de minério de chumbo, como subproduto, em minas próximas do Rio Ribeira entre Cerro Azul e Adrianópolis (BITAR, 1990). Este tipo de exploração vigorou por muito tempo em Adrianópolis, e pelo menos desde 2012 a instalação de indústrias próximas aos distritos rurais, pode ter contribuído para que estas alterações ambientais favorecessem a seleção de flebotomíneos que adaptaram-se melhor a este tipo de paisagem modificada, como parece ser o caso de *L. (N.) intermedia*.

Estudos realizados em outras regiões do país apontam para uma maior densidade de *L. (N.) intermedia* nos meses quentes, como entre outubro e fevereiro, em Silva Jardim e Casimiro de Abreu (SOUZA *et al.*, 2001), em

Petrópolis (SOUZA *et al.*, 2002; 2005) e em Angra dos Reis (AGUIAR *et al.*, 2014) (Rio de Janeiro), no Espírito Santo (VIRGENS *et al.*, 2008) e em março em Iporanga (São Paulo) (GALATI *et al.*, 2010). Contudo, Forattini (1973) descreve um comportamento irregular desta espécie, indicando maior abundância nos meses mais frios. Rangel *et al.* (1990), no estado do Rio de Janeiro, também registrou a presença de *L. (N.) intermedia* durante o ano todo, com os meses de junho, agosto e outubro apresentando maior densidade. Em Mirandópolis (São Paulo), Odorizzi & Galati (2007) determinaram a maior abundância de *L. (N.) intermedia* no Inverno. Em Terra Boa, Teodoro *et al.* (1993) encontraram *L. (N.) intermedia* em maior número no Outono.

Em vários municípios do norte do Paraná, Luz *et al.* (2000) verificaram maior abundância de *L. (N.) whitmani* entre dezembro e março (Verão), e entre março e junho (Outono). Em área urbana de Cianorte, Cerino *et al.* (2009) também detectaram a predominância de *L. (N.) whitmani*, seguida de *L. (N.) intermedia*, com maior número de insetos sendo coletado no período entre novembro e abril. Em Bandeirantes, Cruz *et al.* (2013) coletaram *L. (N.) intermedia* em maior quantidade, seguida de *L. (N.) whitmani*, que atingiram seu pico durante a estação seca. No mesmo município, Massafera *et al.* (2005) observaram *L. (N.) whitmani* (em maior número) e *L. (N.) intermedia* sendo mais frequentes em março e abril, quando as temperaturas e precipitações ainda são elevadas. Estes são, via de regra, os padrões para as densidades destas espécies no estado do Paraná (CONSOLIM *et al.*, 1990; TEODORO *et al.*, 1993a; 2001; 2003; LEGRIFON *et al.*, 2012; NEITZKE-ABREU *et al.*, 2012). De fato, neste trabalho, com as coletas com a armadilha de Shannon, *L. (N.) intermedia* mostrou-se muito mais abundante no Verão (mês de março) e Primavera (outubro e novembro) que em relação ao Outono (abril e maio) e ao Inverno (julho e agosto).

Neste trabalho foram observadas duas reduções no número de exemplares de *L. (N.) intermedia* coletados no peridomicílio da propriedade 2, em novembro de 2010 e janeiro de 2011, mesmo com a elevação contínua da temperatura. Apenas a proporção de espécimes coletados em outubro em relação a dezembro não apresentou diferença estatisticamente significativa. Conforme os dados de pluviosidade apresentados, nas datas das coletas de novembro e janeiro houve precipitação. De acordo com Domingos *et al.* (1998),

as chuvas tendem a reduzir a população flebotomínica, possivelmente devido ao impacto destas sobre os criadouros.

De um modo geral, em Adrianópolis *L. (N.) intermedia* apresentou uma maior preferência pelos períodos que compreendem os horários da primeira metade da noite, com uma maior frequência entre 21 e 24h, para em seguida entrar em declínio. No Inverno, quando as temperaturas foram mais baixas, a espécie apresentou maior abundância entre 18 e 20h. Na segunda metade da noite, a espécie exibiu picos geralmente entre 02 e 03h. Forattini *et al.* (1976) consideram que a temperatura ótima para os flebotomíneos seja em torno dos 20°C. A média da temperatura para o período compreendido entre as 21 e 24h de todas as coletas, com exceção do Inverno, foi de 19,6°C, enquanto que para o mesmo período, nas coletas do Inverno, este valor foi de 14,9°C.

Em Petrópolis, Souza *et al.* (2005) também verificaram *L. (N.) intermedia* no ambiente peridomiciliar em condições semelhantes ao presente estudo, com a primeira metade da noite apresentando os maiores picos de frequência deste flebotomíneo, principalmente entre 21 e 22h. Na área estudada pelos autores, *L. (N.) whitmani* foi a espécie prevalente no ambiente silvestre, que mostrou maior atividade no meio da noite.

Em Terra Boa, a atividade noturna de *L. (N.) whitmani* apresentou o maior pico entre 04 e 05h, enquanto *L. (N.) intermedia* mostrou preferência pelos horários entre 22 e 24h (TEODORO *et al.*, 1993). Em Maringá, *L. (N.) whitmani* apresentou maior pico entre 24 e 02h (TEODORO *et al.*, 2003), enquanto que em Bandeirantes, esta espécie e *L. (N.) intermedia* apresentaram maior pico de frequência entre 20 e 21h (MASSAFERA *et al.*, 2005), 22 e 02h (para *L. (N.) intermedia*) e entre 20 e 22h e 20 e 24h (para *L. (N.) whitmani*) (CRUZ *et al.*, 2013).

O aumento progressivo da atividade de *L. (N.) intermedia* até a metade da noite, para decrescer em seguida, já foi relatado no Vale do Ribeira paulista, por Forattini *et al.* (1976) e Domingos *et al.* (1998) no município de Pedro de Toledo, por Gomes *et al.* (1983) no município de Pariquera-Açú e por Galati *et al.* (2010) no município de Iporanga, onde a espécie prevaleceu entre 19 e 21h. Ainda no estado de São Paulo, *L. (N.) intermedia* exibiu o mesmo comportamento, e foi mais numerosa em setembro, sendo que é o mês de

junho foi o que apresentou menos espécimes, no município de Teodoro Sampaio (CONDINO *et al.*, 1998).

Fuenzalida *et al.* (2011), no departamento de Monteros (Tucumán, Argentina), determinaram a maior densidade de *L. (N.) intermedia* no mês de abril (Outono), quando alcançou o pico entre 03 e 04h, e em janeiro (Verão) a espécie foi mais frequente na primeira metade da noite. Os autores relacionaram estes resultados com o fato dos moradores ainda permanecerem fora das suas residências no período de Verão, estando expostos à atividade dos flebotomíneos, enquanto que no Outono a implicação epidemiológica estaria ligada aos hábitos endofágicos e endofílicos de *L. (N.) intermedia*. Os resultados do presente trabalho corroboram o relato deste pico de frequência entre 03 e 04h por Fuenzalida *et al.* (2011), uma vez que, apesar de declinar na segunda metade da noite em Adrianópolis, *L. (N.) intermedia* apresentou picos de frequência entre 03 e 04h na Primavera, e entre 02 e 03h no Verão, Outono e Inverno.

Na tentativa de buscar melhores condições, em função da baixa temperatura nestes horários, *L. (N.) intermedia* em Adrianópolis poderia apresentar a tendência de invadir as casas, viabilizando a transmissão de *L. (V.) braziliensis* dentro do próprio domicílio. *Lutzomyia (N.) intermedia* é reconhecida por ter comportamento antropofílico, e pela tendência que apresenta em invadir os domicílios, não somente para buscar fontes sanguíneas, mas também abrigo (NERY-GUIMARÃES, 1955; FORATTINI *et al.*, 1976). Campbell-Lendrum *et al.* (1999) chamam a atenção para o caráter endofágico e endofílico de *L. (N.) intermedia* e sua atração pela luz, o que influiria positivamente no encontro do hospedeiro humano. Esta busca pelo abrigo domiciliar poderia justificar, em parte, o declínio da população de *L. (N.) intermedia* a partir da meia noite, tornando-se então o domicílio um dos fatores mais importantes para a transmissão de *Leishmania* neste cenário.

Esta plasticidade ecológica exibida por *L. (N.) intermedia* pode ser explicada pelas conclusões a que chegaram os estudos genéticos sobre esta espécie, que demonstraram a existência de grande variabilidade intra-específica. Marcondes *et al.* (1997) sequenciaram DNA mitocondrial de seis populações do Sul e Sudeste do Brasil, e encontraram haplótipo pertencente a *L. (N.) whitmani* em uma das populações, o que poderia sugerir introgressão



entre as duas espécies. A mesma hipótese foi apresentada por Mazzoni *et al.* (2006), que utilizaram o gene *period* para demonstrar a possibilidade de introgressão entre *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*, e por Mazzoni *et al.* (2008), que também relataram a possibilidade de fluxo gênico entre as duas espécies por meio de análise multiloco de 10 *loci* nucleares.

Meneses *et al.* (2005), verificando populações de *L. (N.) intermedia* do município de Mesquita (Rio de Janeiro), encontraram homogeneidade genética por meio de MLEE e SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Única) e baixo nível de estruturação populacional por meio de RAPD (Amplificação Randômica de DNA). Rocha *et al.* (2007) utilizaram RAPD ao estudarem populações de áreas endêmicas do Espírito Santo (Viana e Afonso Cláudio), e encontraram baixo nível de estruturação genética entre as populações destas duas áreas. Os autores, porém, detectaram alto nível de estruturação genética das populações coletadas nos diferentes ecótopos de Viana, sugerindo uma independência entre o ciclo doméstico e o ciclo peridomiciliar de transmissão de *L. (V.) braziliensis*. Gonçalves (2010) também utilizou RAPD para caracterizar populações de *L. (N.) intermedia* provenientes de Cerro Azul e Adrianópolis (Paraná), onde encontrou grande variabilidade intra-específica e evidências da existência de migração e fluxo gênico entre as populações das duas áreas.

*Lutzomyia migonei*, a segunda espécie mais prevalente nas coletas com a armadilha de Shannon neste trabalho, foi a única que esteve presente em todas as estações, juntamente com *L. (N.) intermedia*. O flebotomíneo *L. migonei* foi mais numeroso na Primavera, sendo detectado em maior número nos horários entre 23 e 01h, no Verão entre 22 e 23h e no Outono entre 18 e 20h. Teodoro *et al.* (1993), em Terra Boa, detectaram *L. migonei* tendo maior atividade entre 01 e 03h, e prevalecendo no Verão. Barretto (1943) e Forattini (1973) apontam para a ausência de *L. migonei* em alguns períodos do ano, como os meses secos e frios. Apesar dos picos de frequência estarem na primeira metade da noite, no presente trabalho *L. migonei* apresentou maior densidade na segunda metade. Recai também sobre *L. migonei* o papel vetorial de *Leishmania*, por ter sido encontrado com formas flageladas por Pessoa & Coutinho (1941). Em Baturité, Ceará, a espécie também foi encontrada com flagelados por Azevedo *et al.* (1991). Em Angra dos Reis,

Aguiar *et al.* (2014) demonstraram o caráter exofílico de *L. migonei*, sugerindo que a espécie possa atuar como vetor secundário no peridomicílio; e no ambiente silvestre, mantendo o foco enzoótico natural. Este nicho, em relação à mata, pode estar sendo desempenhado por *L. migonei* na área estudada da presente investigação, pois próximo ao ponto de coleta existem mata secundária e resíduos da floresta primária, onde os moradores levam a efeito a prática de caça, pesca e estabelecem novas áreas para a agricultura, constituindo o ambiente silvestre um dos ecótopos em que a transmissão de *Leishmania* é factível.

O maior número de exemplares capturados da espécie *L. migonei* em relação a *L. (P.) fischeri* neste trabalho pode refletir um aspecto mais acentuado daquela espécie em ser atraída pela cor branca da armadilha, e portanto em adaptar-se aos ambientes antrópicos, ao contrário dos ambientes sombreados e úmidos, em que *L. (P.) fischeri* seria mais prevalente (MOSCHIN *et al.*, 2013). No norte do Paraná, Teodoro *et al.* (1993) encontraram maior densidade de *L. (P.) fischeri* no mês de fevereiro. No nosso trabalho, em Adrianópolis, a espécie foi mais frequente na Primavera e Verão, e teve preferência acentuada pelos horários da segunda metade da noite, com 19 exemplares coletados neste período de um total de 24. Os horários que apresentaram maior frequência foram entre 03 e 04h, 05 e 06h e entre 01 e 02h. Na Serra da Cantareira, região da Grande São Paulo, Moschin *et al.* (2013) verificaram maior abundância de *L. (P.) fischeri* na Primavera, e durante a segunda metade da noite, além de verificarem a ocorrência de antropofilia desta espécie pela captura de exemplares tentando realizar o repasto sanguíneo. Os autores correlacionaram estes achados com a maior possibilidade de transmissão de *Leishmania* próxima ao amanhecer.

Esta condição parece estar relacionada com o resultado do presente trabalho referente à pesquisa de antropofilia, pois as fêmeas capturadas tentando realizar o repasto sanguíneo nos coletores pertenciam à espécie *L. (P.) fischeri*, e esta captura foi feita entre 01 e 02h. Souza *et al.* (2005) encontraram um padrão semelhante em Petrópolis, com maior intensidade de antropofilia praticada no início da manhã por *L. (N.) whitmani*, e no início da noite, por *L. (N.) intermedia*. Assim, os autores relacionam estes resultados

com a possibilidade de transmissão de *L. (V.) braziliensis* para os trabalhadores que iniciam suas atividades no início da manhã.

*Lutzomyia (P.) fischeri* foi a segunda espécie mais coletada com as armadilhas CDC, e a terceira mais coletada com a armadilha de Shannon. Alguns estudos têm discutido o potencial papel de *L. (P.) fischeri* na manutenção da enzootia silvestre associada a *L. (V.) braziliensis* (RANGEL & LAINSON, 2009; PITA-PEREIRA *et al.*, 2011). Em adição, Barretto (1943) faz referência ao encontro de *L. (P.) fischeri* realizando o repasto sanguíneo durante o dia, e Coutinho & Barretto (1941) aceitam a responsabilidade da espécie por participar da transmissão do protozoário, em face da sua acentuada antropofilia e pela abundância em áreas com ocorrência de LTA.

Apesar de *L. (N.) intermedia* não ter sido por nós capturada praticando o repasto sanguíneo nos coletores, pela sua biologia e densidade na área pesquisada, recai sobre a mesma a suspeita de atuar como espécie vetora em Adrianópolis. Em Pedro de Toledo, Gomes *et al.* (1983) observaram que a hematofagia desta espécie iniciou nas horas precedentes ao crepúsculo vespertino e se encerrou logo após as primeiras horas que sucederam ao crepúsculo matutino. Em Petrópolis, Souza *et al.* (2002) capturaram *L. (N.) intermedia* sugando os coletores, especialmente no peridomicílio, e nos meses mais quentes.

*Lutzomyia (N.) intermedia* é incriminada pela transmissão de *L. (V.) braziliensis* em áreas endêmicas de LTA do Sudeste e Sul, como em Minas Gerais (LEMON & LIMA, 2005; SARAIVA *et al.*, 2006), Espírito Santo (FALQUETO, 1995; VIRGENS *et al.*, 2008), São Paulo (FORATTINI *et al.*, 1976; GOMES *et al.*, 1986; CONDINO *et al.*, 1998; GALATI *et al.*, 2010), Rio de Janeiro (RANGEL *et al.*, 1990; SOUZA *et al.*, 2001; 2002; 2005; RODRIGUES *et al.*, 2013; AGUIAR *et al.*, 2014), Paraná (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009) e mesmo em outras regiões, como na Bahia (PEREIRA & HOCH, 1990).

A capacidade vetorial de *L. (N.) intermedia* foi demonstrada pela primeira vez por Aragão (1922) no Rio de Janeiro, ao produzir lesão no focinho de um cão, a partir da inoculação de triturado de exemplares dessa espécie infectados com *L. (V.) braziliensis*. A espécie foi encontrada naturalmente infectada por flagelados por Forattini & Santos (1952) no Paraná, Forattini *et al.* (1972) em São Paulo e por Rangel *et al.* (1984) no Rio de Janeiro. Rangel *et al.* (1992;

1993), Silva & Gomes (2001) e Diniz *et al.* (2014) também obtiveram a infectividade experimental de *L. (N.) intermedia* por *L. (V.) braziliensis*.

Apenas três exemplares da espécie *L. (P.) pessoai* foram capturados no presente trabalho, dois com as armadilhas CDC e um por meio da armadilha de Shannon. Este flebotomíneo esteve presente na primeira metade da noite no Verão, entre 21 e 22h. No Pontal do Paranapanema, estado de São Paulo, *L. (P.) pessoai* foi mais frequente no Outono e na Primavera, prevalecendo entre 20 e 21h (ALESSI *et al.*, 2009). No município de Itambaracá (Paraná), em duas localidades rurais sob a influência das usinas hidrelétricas Canoas I e II, no Rio Paranapanema, Cruz *et al.* (2012) identificaram o predomínio de *L. (P.) pessoai*, seguida de *L. (N.) intermedia*. Em relação à primeira, recairia sobre si o papel vetorial nas áreas de matas mais preservadas, enquanto que é relacionada à segunda maior densidade em áreas degradadas. De acordo com Rangel & Lainson (2003), *L. (P.) pessoai* é um dos possíveis flebotomíneos vetores de *L. (V.) braziliensis* no Brasil.

As demais espécies por nós capturadas neste trabalho, *L. firmatoi* e *L. (E.) edwardsi*, foram as menos frequentes. Em levantamento realizado por Silva *et al.* (2008) no estado do Paraná, *L. firmatoi* mostrou-se uma espécie de hábitos silvestres, enquanto que Ashford *et al.* (2010) consideram *L. (E.) edwardsi* como uma das espécies vetoradas de *L. (V.) braziliensis* no Brasil, sendo que este flebotomíneo foi diagnosticado com o protozoário em Cotia (São Paulo) por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (SUCEN, 2005).

Os resultados negativos da pesquisa de infecção natural por *L. (V.) braziliensis* nos flebotomíneos são condizentes com os resultados de outros estudos que utilizam a dissecação como método de busca do protozoário (GOMES *et al.*, 1990), o que sugere a condição destes vetores de estarem sob uma baixa pressão parasitária (CASTRO *et al.*, 2005; GONÇALVES, 2010). Esta condição é muito mais acentuada para *L. (N.) intermedia*, quando considerada a abundância desta espécie em relação às demais.

A eficácia dos métodos moleculares para detecção da infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos, em comparação com a dissecação, é evidenciada pela sensibilidade destes métodos: por meio da PCR Multiplex, *L. (N.) intermedia* foi detectada com o DNA de *L. (V.) braziliensis* no Rio de

Janeiro por Pita-Pereira *et al.* (2005) e no Rio Grande do Sul por Pita-Pereira *et al.* (2009). Entretanto, Rocha *et al.* (2010) chamam a atenção para a necessidade de aprimoramento destas técnicas moleculares, em razão da possibilidade de reação cruzada com outros tripanosomatídeos. Recentemente, Marcussi *et al.* (2013) avaliaram o desempenho de *primers* específicos para *L. (V.) braziliensis*, com baixa correlação com os resultados de outros métodos diagnósticos, mas com 87,7% de especificidade para a identificação de um dos serodemas desta espécie. É importante salientar que o método de dissecação constitui a única alternativa que permite detectar a infecção por *Leishmania* e o posterior isolamento e caracterização do parasito por métodos bioquímicos e moleculares.

Svobodová *et al.* (2009) procurando determinar os vetores em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na Turquia, encontraram alta prevalência de infecção das fêmeas de *Phlebotomus (Larroussius) tobbi* com *L. (L.) infantum*. Esta alta prevalência de infecção encontrada é apontada pelos autores como devida ao comportamento antropofílico de *P. (L.) tobbi* na região, coincidindo com o alto número de casos humanos, sugerindo um ciclo de transmissão antroponótico para *L. (L.) infantum*. Kato *et al.* (2013) também realizaram disseções nos intestinos de flebotomíneos coletados em área endêmica de LTA no Equador, encontrando *Lutzomyia (Nyssomyia) yuilli yuilli* parasitada por protozoários do gênero *Endotrypanum* e *Lutzomyia (Lutzomyia) tortura* parasitada com *L. (V.) naiffi*, esta última com maior número de flagelados. Enquanto que *L. (L.) tortura* foi coletada essencialmente por meio de isca humana, *L. (N.) yuilli yuilli* foi também coletada por meio de armadilhas luminosas (CDC e Shannon), sugerindo os autores que aquela espécie possui maior predileção pela hematofagia e justificando o fato de terem encontrado maior número de flagelados, pois o parasito prolifera e se desenvolve melhor em flebotomíneos que são mais atraídos por fontes sanguíneas, resultando em maior transmissão do mesmo entre os hospedeiros mamíferos. Esta condição aventada para *L. (N.) yuilli yuilli* poderia ser sugerida em relação a *L. (N.) intermedia* em Adrianópolis, que prevalece no ambiente antrópico e onde há a presença de fontes luminosas que garantem a sua atração, enquanto que *L. (L.) tortura* seria análoga a *L. (P.) fischeri*, que foi coletada praticando hematofagia nos coletores.

Assim, o presente estudo evidencia a importância dos flebotomíneos vetores na cadeia de transmissão de *L. (V.) braziliensis* em Adrianópolis. Pela alta densidade e plasticidade ecológica, *L. (N.) intermedia* deve ser considerada como espécie vetora, oferecendo maior risco de infecção para as populações humana e animal nos meses mais quentes (Primavera e Verão) durante toda a noite: no início, quando os trabalhadores estão expostos no peridomicílio; e a partir do meio da noite em diante, possivelmente no domicílio. *Lutzomyia migonei* seria responsável pela manutenção da enzootia silvestre. No entanto, pode ser atraída pela luz no peridomicílio e, ainda, poderia ser responsável juntamente com *L. (N.) intermedia* e *L. (P.) fischeri* pela transmissão de *Leishmania* quando os indivíduos entram na mata para exercer atividades profissionais ou de lazer. Ainda, na segunda metade da noite, e especialmente na Primavera e Verão, o potencial vetorial deve pesar também sobre *L. (P.) fischeri*, pelo encontro desta espécie praticando hematofagia a partir de 00h, e pelo encontro da maior parte dos seus representantes a partir das 03 e 04h e 05 e 06h, períodos em que os trabalhadores rurais saem das residências para exercer suas atividades. Esta última hipótese tende a ser ratificada pelo fato de que os casos humanos de LTA em Adrianópolis consistem majoritariamente em adultos do sexo masculino. A Figura 18 faz um resumo gráfico dos possíveis ciclos de transmissão de *Leishmania* na área por nós estudada, levando em consideração os diferentes flebotomíneos vetores, ecótopos e fatores de risco.

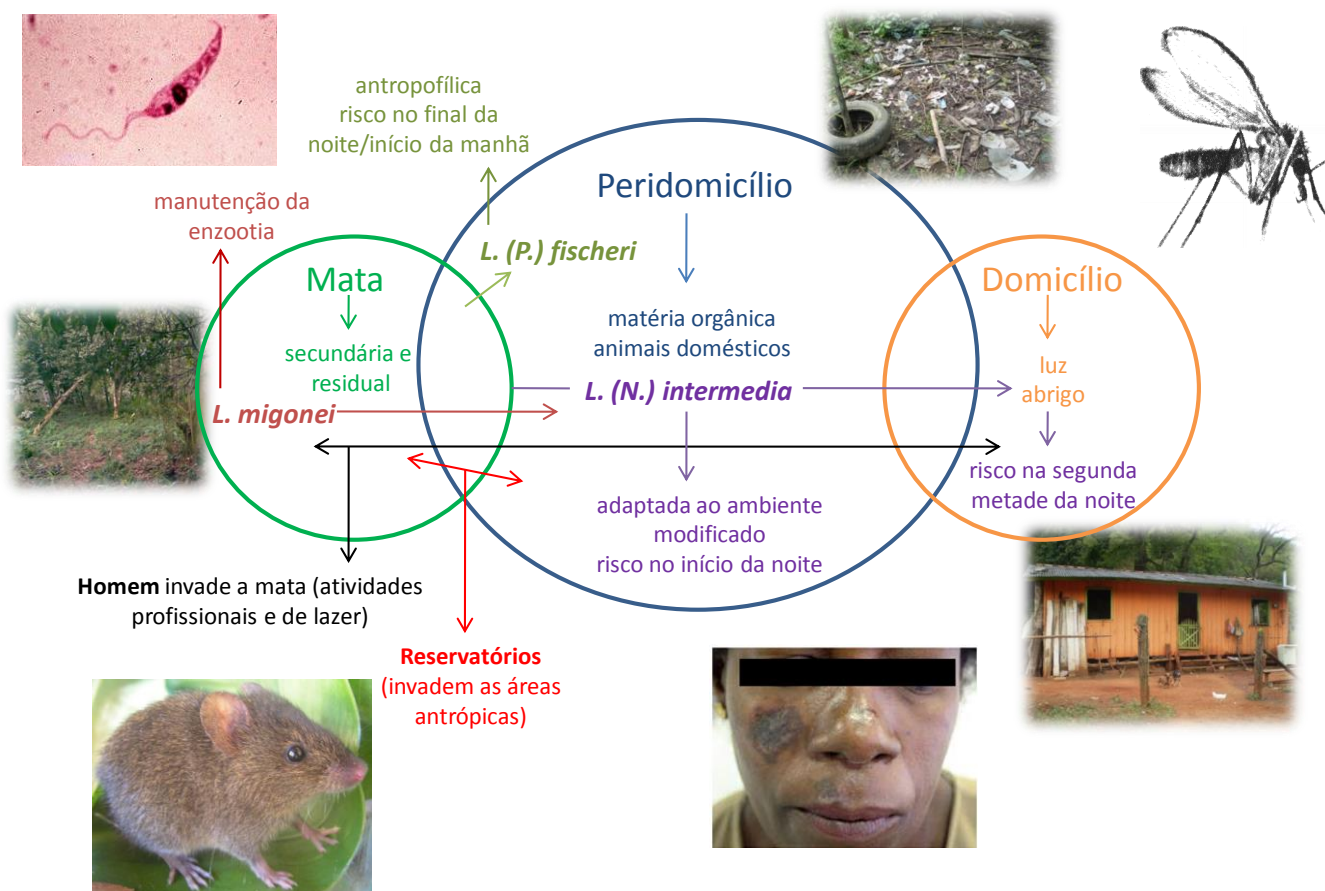


Figura 18: Esquema dos ciclos de transmissão de *L. (V.) braziliensis* na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, Brasil

## 7 CONCLUSÕES

1 Durante o período estudado (outubro de 2010 a janeiro de 2011, e outubro de 2012 a agosto de 2013), foram coletados 10.058 flebotomíneos em Adrianópolis, Paraná, sendo que esta fauna foi representada pelas espécies *L. (N.) intermedia* (99,11% dos flebotomíneos coletados com armadilhas CDC e 99,34% dos coletados com armadilha de Shannon), *L. migonei* (0,34% dos dos flebotomíneos coletados com armadilha de Shannon), *L. (P.) fischeri* (0,69% dos flebotomíneos coletados com armadilhas CDC e 0,26% dos coletados com armadilha de Shannon), *L. firmatoi* (0,02% dos flebotomíneos coletados com armadilha de Shannon), *L. (P.) pessoai* (0,19% dos flebotomíneos coletados com armadilhas CDC e 0,01% dos coletados com armadilha de Shannon) e *L. (E.) edwardsi* (também 0,01% dos flebotomíneos coletados com armadilha de Shannon); com ampla abundância de *L. (N.) intermedia* em todos os ecótopos – domicílio, peridomicílio e mata. *Lutzomyia migonei* e *L. (P.) fischeri* foram a segunda e a terceira espécies mais abundantes, respectivamente;

2 O espaço peridomiciliar e a paisagem com influência antrópica oferecem situação de risco para a infecção por *L. (V.) braziliensis* por permitir a seleção natural de *L. (N.) intermedia*, que foi encontrada com alta densidade (99,27% dos flebotomíneos coletados com armadilhas CDC neste ecótopo);

3 A fauna flebotomínica em Adrianópolis apresentou maior densidade nos períodos mais quentes – Verão e Primavera, quando compareceram 5.772 e 1.189 flebotomíneos, o que corresponde a 63,82 e 13,14% do total destes dípteros capturados com a armadilha de Shannon, respectivamente;

4 *Lutzomyia (N.) intermedia* foi a espécie mais abundante em todas as estações climáticas, com 97,56, 99,74, 98,92 e 99,62% dos flebotomíneos capturados na Primavera, Verão, Outono e Inverno, respectivamente. *Lutzomyia migonei* foi a segunda espécie mais frequente no Verão e Outono, com 0,14 e 0,97% dos flebotomíneos coletados nestas estações, respectivamente. *Lutzomyia (P.) fischeri* foi a segunda espécie mais abundante na Primavera, e a terceira no Verão, correspondendo a 1,43 e a 0,1% dos



flebotomíneos presentes nestas duas estações, respectivamente. *Lutzomyia firmatoi* foi a segunda espécie mais frequente no Inverno, com 0,19% dos flebotomíneos capturados nesta estação, enquanto *L. (P.) pessoai* e *L. (E.) edwardsi* estiveram presentes apenas no Verão e no Outono, respectivamente, correspondendo a 0,01 e a 0,09% dos flebotomíneos coletados em cada uma destas estações;

5 *Lutzomyia (N.) intermedia* apresentou um padrão geral de frequência conforme o decorrer da noite de modo crescente até a sua metade, para a partir de então entrar em declínio. No entanto, esteve presente em todos os horários;

6 O domicílio também oferece situação de risco para a transmissão de *L. (V.) braziliensis*, por permitir a frequência de *L. (N.) intermedia*. Neste caso, a infecção poderia ocorrer provavelmente na segunda metade da noite, quando *L. (N.) intermedia* busca este ecótopo para o encontro de abrigo, em função da queda de temperatura no ambiente externo;

7 Não foram encontradas formas promastigotas de *Leishmania* nos flebotomíneos dissecados, o que denota uma baixa pressão parasitária no ciclo de transmissão do patógeno na região, especialmente no caso de *L. (N.) intermedia*;

8 *Lutzomyia migonei* desempenharia o papel de manutenção do ciclo silvestre de *L. (V.) braziliensis*, e juntamente com *L. (N.) intermedia* e *L. (P.) fischeri*, poderia estar atuando como espécie vetora quando da entrada dos moradores na mata para atividades de lazer ou profissionais;

9 *Lutzomyia (P.) fischeri* foi capturada exercendo atividade antropofílica, ao sugar os coletores na segunda metade da noite, na Primavera. Recai portanto, sobre esta espécie, a suspeita de atuar como vetora de *L. (V.) braziliensis* no ambiente peridomiciliar, uma vez que a maior parte dos seus espécimes foi coletada neste período.

## 8 PERSPECTIVAS

Dentre as doenças tropicais consideradas como negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde, as leishmanioses merecem enorme atenção por parte das instituições científicas e governamentais: estão em expansão, não possuem medidas imunoproláticas disponíveis para uso em seres humanos, apresentam agravantes clínicos diante das imunodrepressões e estão diretamente relacionadas com fatores sócio-econômicos e geográficos.

O sucesso no controle destas enfermidades passa invariavelmente, mas não somente, pelo sucesso no controle dos vetores de seus agentes etiológicos. Este sucesso, por sua vez, está relacionado com a compreensão dos vários aspectos biológicos e epidemiológicos de tais vetores: comportamentais, ecológicos, competência vetorial, genéticos, bioquímicos, taxonômicos, e outros.

No caso da LTA, que no Brasil constitui um dos maiores desafios para a saúde pública, os estudos dos seus principais vetores vêm logrando algum êxito em diferentes campos, porém muitas lacunas carecem de respostas. O presente estudo, em suas investigações pertinentes à região do Vale do Ribeira, no estado do Paraná, procurou fornecer respostas a algumas questões que envolvem uma das principais espécies relacionadas com a epidemiologia da doença no país – *L. (N.) intermedia* – e seu papel na manutenção do ciclo de *L. (V.) braziliensis* naquela área endêmica, juntamente com as espécies menos frequentes, porém não menos importantes, como é o caso de *L. (P.) fischeri*.

Sendo uma espécie polimórfica, recaem sobre *L. (N.) intermedia* as mesmas perguntas que orbitam o entendimento de como muitos táxons de importância sanitária que apresentam situações semelhantes, a exemplo dos complexos de espécies crípticas, diferem em sua importância como vetores de patógenos.

Nesse sentido, colocam-se como perspectivas de trabalho a execução de algumas metodologias que venham a contribuir para responder estas perguntas: ampliação dos estudos genéticos (como a adoção de marcadores isoenzimáticos e moleculares), aprofundamento das pesquisas ecológicas e comportamentais (como estudos de sazonalidade e da verificação do

isolamento reprodutivo entre diferentes populações, mediante o estabelecimento de colônia em laboratório), e estudos bioquímicos (como os que analisam os feromônios envolvidos com a cópula) e de infectividade natural, bem como os relacionados com a taxonomia clássica, como a morfometria de formas adultas e imaturas.

Por fim, espera-se que os resultados deste trabalho possam ser úteis e encorajem o poder público para a adoção de medidas de controle e prevenção da LTA, no Vale do Ribeira e em outras áreas endêmicas. Em corolário, estas medidas devem ser estruturais e permanentes. Tão importantes quanto estas medidas, as intervenções oriundas dos profissionais de saúde e pesquisadores são prementes, em face de que são estes os que estabelecem maior contato com as comunidades das áreas endêmicas. Para tanto, propõe-se o estabelecimento de programas informativos e educacionais, que visem, de maneira geral: (1) a adoção de uma linguagem acessível e didática aos moradores destas comunidades, com especial enfoque nos jovens e crianças, (2) o auxílio para a execução de medidas de saneamento e higiene, e (3) adoção de medidas para evitar a exposição aos flebotomíneos, conforme os horários de maior risco de contrair a infecção, em função da presença dos moradores nos diferentes ecótopos.

Espera-se que a concretização destas propostas seja um dos passos iniciais para a verdadeira emancipação social nestas áreas de baixos índices de desenvolvimento humano.

## 9 REFERÊNCIAS

- ADL, S.M., SIMPSON, A.G., FARMER, M.A., ANDERSEN, R.A., ANDERSON, O.R., BARTA, J.R., BOWSER, S.S., BRUGEROLLE, G., FENSOME, R.A., FREDERICQ, S., JAMES, T.Y., KARPOV, S., KUGRENS, P., KRUG, J., LANE, C.E., LEWIS, L.A., LODGE, J., LYNN, D.H., MANN, D.G., MCCOURT, R.M., MENDOZA, L., MOESTRUP, Ø., MOZLEY-STANDRIDGE, S.E., NERAD, T.A., SHEARER, C.A., SMIRNOV, A.V., SPIEGEL, F.W. & TAYLOR, M.F. 2005. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. **J. Eukaryot. Microbiol.** **52(5)**: 399-451.
- ADLER, S. 1964. *Leishmania*. In: Dawes, B. (Ed.). **Advances in Parasitology**, 2<sup>a</sup>. ed. Academic Press, New York/London, pp. 35-96.
- ADLER, S. & THEODOR, O. 1957. Transmission of disease agents by Phlebotomine sandflies. **Annu. Rev. Entomol.** **2**: 203-226.
- AGUIAR, G.M. & VILELA, M.L. 1987. Aspects of the ecology of sandflies at the Serra dos Órgãos National Park, State of Rio de Janeiro. VI. Shelters and breeding places (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **82**: 585-586.
- AGUIAR, G.M., AZEVEDO, A.C., MEDEIROS, W.M., ALVES, J.R. & RENDEIRO, V. 2014. Aspects of the ecology of phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra dos Reis, coast of Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **56(2)**: 143-149.
- ALESSI, C.A., GALATI, E.A., ALVES, J.R. & CORBETT, C.E. 2009. American cutaneous leishmaniasis in the Pontal of Paranapanema - SP, Brazil: ecological and entomological aspects. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **51(5)**: 277-282.
- ALEXANDER, B., CARVALHO, R.L., McCALLUM, H. & PEREIRA, M.H. 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** **8(12)**: 1480–1485.

- ALVAR, J., VÉLEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J. & den BOER, M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE** **7(5)**: e35671.
- ANDERSON, B.E. & NEUMAN, M.A. 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.** **10(2)**: 203–219.
- ANDRADE-COELHO, C.A. 2007. *Avaliação do impacto da azadiractina sobre a biologia de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e no desenvolvimento da Leishmania (Leishmania) infantum chagasi Cunha e Chagas, 1937*. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2007, 78p.
- ANDRADE-FILHO, J.D., GALATI, E.A. & FALCÃO, A.L. 2003. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **98(8)**: 1059-1065.
- ANDRADE-FILHO, J.D., GALATI, E.A. & FALCÃO, A.L. 2006. Polymorphism, inter-population and inter-specific variation in *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) and *Nyssomyia neivai* (Pinto) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Rev. Bras. Entomol.** **50(3)**: 385-393.
- ANDRADE-FILHO, J.D., GALATI, E.A. & FALCÃO, A.L. 2007. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **102(4)**: 481-487.
- ARAGÃO, H.B. 1922. Transmissão de leishmaniose tegumentar no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. **Brás. Médico** **36**: 129-130.
- ARAGÃO, M.B. & LIMA, L.C. 1987. Sobre a dispersão de *Lutzomyia intermedia* (Diptera, Psychodidae). **Cad. Saúde Pública** **3(4)**: 473-479.
- ARAÚJO-FILHO, N.A. 1979. *Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Ilha Grande*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1979, 144p.

- ARIAS, J.R. & FREITAS R.A. 1977. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 1. Preliminary findings. **Acta Amazon. 7**: 293-294.
- ARIAS, J.R. & FREITAS R.A. 1978. Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia Central do Brasil. 2. Incidência de flagelados em flebótomos selváticos. **Acta Amazon. 8**: 387-396.
- ARIAS, J.R. & NAIFF, R.D. 1981. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 76(3)**: 279-286.
- ARIAS, J.R., MILES, M.A., NAIFF, R.D., POVOA, M.M., FREITAS, R.A., BIANCARDI, C.B. & CASTELLON, E.G. 1985. Flagellate infections of brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 34(6)**: 1098-1108.
- ARTEMIEV, M.M. 1991. A classification of the subfamily Phlebotominae. **Parassitologia 33(1)**: 69-77.
- ASHFORD, R.W., BERN, C., BOELAERT, M., BRYCESON, A.D., CHAPPIUS, F., CROFT, S., DEDET, J.P., DESJEUX, P., GRADONI, L., KILLICK-KENDRICK, R., CUENTAS, L., LÓPEZ-VÉLEZ, R., MODABBER, F., RIJAL, S., SALOTRA, P., SALAH, A.B., SARAIVA, N.G., SHAW, J.J., SUNDAR, S., THAKUR, C., MONDAL, D. & WERNECK, G.L. 2010. Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. **W.H.O. Tech. Rep. Ser. 949**: 1-186.
- AZEVEDO, A.C., RANGEL, E.F., COSTA, M.E., DAVID, J., VASCONCELOS, A.W. & LOPES, U.G. 1990. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85(2)**: 251.

- AZEVEDO, A.C. & RANGEL, E.F. 1991. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **86(4)**: 405-10.
- AZEVEDO, A.C., RANGEL, E.F. & QUEIROZ R.G. 1991. *Lutzomyia migonei* (França, 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **85(4)**: 479.
- AZULAY, R.D. & AZULAY Jr., D.R. 1995. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.** **34(5)**: 303-307.
- BAÑULS, A.L., HIDE, M. & PRUGNOLLE, F. 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. Parasitol.** **64**: 1-109.
- BARRETO, M.L., TEIXEIRA, M.G., BASTOS, F.I., XIMENES, R.A., BARATA, R.B. & RODRIGUES, L.C. 2011. Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. **Lancet – Saúde no Brasil** **3**: 47–60.
- BARRETTO, M.P. 1943. *Observações sobre biologia em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Díptera: Psychodidae)*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1943, 162p.
- BARROS, V.L., REBELO, J.M., & SILVA, F.S. 2000. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira do Município do Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Área de transmissão de leishmaniose. **Cad. Saúde Pública** **16(1)**: 265-270.
- BASANO, A. & CAMARGO, L.M. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.** **7(3)**: 328-337.
- BATES, P.A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol.** **37(10)**: 1097–106.

- BERMÚDEZ, E.G. 2009. ***Lutzomyia* Sand Flies in the Brazilian Amazon Basin (Diptera: Psychodidae)**, INPA, Manaus.
- BITAR, O.Y. 1990. *Mineração e usos do solo no litoral paulista: estudo sobre conflitos, alterações ambientais e riscos*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1990, 162p.
- BRANDÃO-FILHO, S.P., CAMPBELL-LENDRUM, D.H., BRITO, M.E., SHAW, J.J. & DAVIES, C.R. 1999. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **93(5)**: 488-494.
- BRANDÃO-FILHO, S.P., BRITO, M.E., CARVALHO, F.G., ISHIKAWA, E.A., CUPOLILLO, E., FLOETER-WINTER, L. & SHAW, J.J. 2003. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **97(3)**: 291-296.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2006. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**, 1ª. ed. Editora MS, Brasília.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2007. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2ª. ed. Editora MS, Brasília.
- BRASIL, Ministério da Saúde. 2014. Sistema de Informação de Agravos de Notificação [Internet]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: 19/08/2014.
- BRUMPT, E. & PEDROSO, A. 1913. Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de São Paulo. **Ann. Paul. Med. Cir.** **1(4)**: 97-136.
- BUSTAMANTE, M.C., PEREIRA, M.J., SCHUBACH, A.O. & FONSECA, A.H. 2009. Epidemiological profile of cutaneous leishmaniasis in an endemic region in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** **18(3)**: 34-40.



- CAMARGO, J.B. 1998. **Geografia Física, Humana e Econômica do Paraná**, 2ª. ed., Clichetec, Paranavaí.
- CAMPBELL-LENDRUM, D., PINTO, M.C. & DAVIES, C. 1999. Is *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) more endophagic than *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) because it is more attracted to light? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **94(1)**: 21-22.
- CARVALHO, G.M., BRAZIL, R.P., SARAIVA, L., QUARESMA, P.F., BOTELHO, H.A., RAMOS, M.C., ZENÓBIO, A.P., SERRA, E., MEIRA, P.C., SANGUINETTE, C.C. & ANDRADE FILHO, J.D. 2012. Hourly activity and natural infection of sandflies (Diptera: Psychodidae) captured from the aphotic zone of a Cave, Minas Gerais State, Brazil. **PLoS ONE** **7(12)**: e52254.
- CASANOVA, C., MAYO, R.C., MASCARINI, L.M., PIGNATI, M.G., GALATI, E.A. & GOMES, A.C. 1995. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) infection in the Valley of Mogi Guaçu river, State of São Paulo, Brazil. **Bol. Dir. Malariol. San. Amb.** **35(1)**: 77-84.
- CASTRO, G.O. 1937. **Sobre um processo de cultura de flebótomos. Nota prévia**. In: Sociedade de Biologia, sessão de 8 de outubro, Rio de Janeiro.
- CASTRO, E.A., THOMAZ-SOCCOL, V., LUZ, E. & MEMBRIVE, N., 2002. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **35(5)**: 445-452.
- CASTRO, E.A., LUZ, E., TELLES, F.Q., PANDEY, A., BISETO, A., DINAISKI, M., SBALQUEIRO, I. & THOMAZ-SOCCOL, V. 2005. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Trop.** **93(2)**: 141-149.
- CASTRO, E.A., THOMAZ-SOCCOL, V., AUGUR, C. & LUZ, E. 2007. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Exp. Parasitol.** **117(1)**: 13-21.

- CELLA, W., MELO, S.C., LEGRIFTON, C.M., FREITAS, J.S., KUHLMANN, J.B., TEODORO, U. & ROSSI, R.M. 2011. Flebotomíneos de localidades rurais no noroeste do Estado do Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública** **27(12)**: 2461-2468.
- CERINO, D.A., TEODORO, U. & SILVEIRA, T.G. 2009. Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in the urban area of the municipality of Cianorte, Paraná State, Brazil. **Neotrop. Entomol.** **38(6)**: 853-858.
- CHANLOTIS, B.N. 1967. The biology of California *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. **J. Med. Entomol.** **4(2)**: 221–233.
- CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R.W., ALVAR, J. & BOELAERT, M. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.** **5(11)**: 873-882.
- CHRISTENSEN, H.A., ARIAS, J.R., VASQUEZ, A.M. & FREITAS, R.A. 1982. Hosts of sand fly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Central Amazon of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **31(2)**: 239-242.
- CONDINO, M.L., SAMPAIO, S.M., HENRIQUES, L.F., GALATI, E.A., WANDERLEY, D.L. & CORRÊA, F.M. 1998. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **31(4)**: 355-360.
- CONFALONIERI, U.E., MARGONARI, C. & QUINTÃO, A.F. 2014. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. **Acta Trop.** **129(2014)**: 33-41.
- CONSOLIM, J., LUZ, E. & TORRES, P.B. 1990. Flebótomos da área do reservatório da hidroelétrica de Itaipu, estado do Paraná, Brasil (Diptera, Psychodidae). **Cad. Saúde Pública** **6(1)**: 86-89.
- CONVIT, J., ULRICH, M., FERNÁNDEZ, C.T., TAPIA, F.J., CÁCERES-DITTMAR, G., CASTÉS, M. & RONDÓN, A.J. 1993. The clinical and

- immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **87(4)**: 444-448.
- CORTES, S., MAURÍCIO, I.L., KUHLS, K., NUNES, M., LOPES, C., MARCOS, M., CARDOSO, L., SCHÖNIAN, G. & CAMPINO, L. 2014. Genetic diversity evaluation on portuguese *Leishmania infantum* strains by multilocus microsatellite typing. **Infect. Genet. Evol.** **26**: 20-31.
- COSTA, P.L., DANTAS-TORRES, F., SILVA, F.J., GUIMARÃES, V.C., GAUDÊNCIO, K. & BRANDÃO-FILHO, S.P. 2013. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in northeastern Brazil. **Acta Trop.** **126(2)**: 99-102.
- COUTINHO, J.O. & BARRETTO, M.P. 1941. Dados bionômicos sobre o "*Phlebotomus fischeri*" Pinto, 1926 (Diptera, Psychodidae). **Rev. Bras. Biol.** **1**: 423-429.
- CPRM, Serviço Geológico do Brasil. 2014. Projeto Paisagens Geoquímicas e Ambientais do Vale do Ribeira. Atlas Geoambiental [Internet]. Disponível em: [http://www.cprm.gov.br/gestao/ppga\\_valedoribeira/](http://www.cprm.gov.br/gestao/ppga_valedoribeira/). Acesso em: 31/07/2014.
- CRUZ, M.F., GALATI, E.A. & CRUZ, C.F. 2012. Ecological aspects of the sandfly fauna (Diptera, Psychodidae) in an American cutaneous leishmaniasis endemic area under the influence of hydroelectric plants in Paranapanema river, State of Paraná, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **45(4)**: 430-436.
- CRUZ, C.F., CRUZ, M.F. & GALATI, E.A. 2013. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **108(3)**: 303-311.
- CUPOLILLO, E., GRIMALDI Jr., G. & MOMEN, H. 1995. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic *loci*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **89(1)**: 17-23.

- DEANE, M.P. & DEANE, L.M. 1955. Observações sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Ceará. **O Hospital** **48**: 347-364.
- DEANE, L.M. & DEANE, M.P. 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **4**: 198-212.
- De BRUIJN, M.H. & BARKER, D.C. 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Trop.** **52(1)**: 45-58.
- DEDET, J.P., PAJOT, F.X., DESJEUX, P., GOYOT, P., CHIPPAUX, J.P. & GEOFFROY, B. 1985. Natural hosts of *Leishmania mexicana amazonensis* Lainson and Shaw, 1972 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in French Guiana. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **79(3)**: 302-305.
- DEDET, J.P., PRATLONG, F., LANOTTE, G. & RAVEL, C. 1999. Cutaneous leishmaniasis. The parasite. **Clin. Dermatol.** **17(3)**: 261-268.
- DESJEUX, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** **27(5)**: 305-318.
- DINIZ, M.M., OVALLOS, F.G., GOMES, C.M., LAVITSCHKA, C.O. & GALATI, E.A. 2014. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasite Vector** **7**: 139.
- DOMINGOS, M.F., CARRERI-BRUNO, G.C., CIARAVOLO, R.M., GALATI, E.A., VALÉRIO, D.M. & CORRÊA, F.M. 1998. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro de Toledo, região sul do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **31(5)**: 425-432.
- DUJARDIN, J.C. 2006. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends Parasitol.** **22(1)**: 4-6.
- FALQUETO, A. 1995. *Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no Estado do Espírito Santo*. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 1995. 84p.

- FALQUETO, A., SESSA, P.A., FERREIRA, A.L., VIEIRA, V.P., SANTOS, C.B., VAREJÃO, J.B., CUPOLILLO, E., PORROZZI, R., CARVALHO-PAES, L.E. & GRIMALDI Jr., G. 2003. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **98(8)**: 1003-1010.
- FELICIANGELI, M.D. 1997. Hourly activity of *Lutzomyia ovalessi* and *L. gomezi* (Diptera: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in northcentral Venezuela. **J. Med. Entomol.** **34**: 110-115.
- FORATTINI, O.P. 1953. Nota sobre criadouros naturais de flebótomos em dependências peri-domiciliares, no Estado de São Paulo. **Arq. Hig. São Paulo** **7**: 157-167.
- FORATTINI, O.P. 1960. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **2(4)**: 195-203.
- FORATTINI, O.P. 1973. **Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose**, vol. 4., Editora Edgar Blucher Ltda./EDUSP, São Paulo.
- FORATTINI, O.P. & SANTOS, M.R. 1952. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912, por formas em leptomonas, em um foco de leishmaniose tegumentar americana. **Arq. Hig. São Paulo** **17**: 171-174.
- FORATTINI, O.P., PATTOLI, D.B., RABELLO, E.X. & FERREIRA, O.A. 1972. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **6**: 431-433.
- FORATTINI, O.P., RABELLO, E.X., SERRA, O.P., COTRIM, M.D., GALATI, E.A. & BARATA, J.M. 1976. Observações sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **10(1)**: 31-43.
- FRAGA J., MONTALVO, A.M., AUWERA, G.V., MAES, I., DUJARDIN, J.C. & REQUENA, J.M. 2013. Evolution and species discrimination according to

- the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. **Infect. Genet. Evol.** **18**: 229-237.
- FRIEND, W.G. & SMITH J.J. 1975. Feeding in *Rhodnius prolixus*: Increased sensitivity to ATP during prolonged food deprivation. **J. Insect. Physiol.** **21(5)**: 1081-1084.
- FRIEND, W.G. & STOFFOLANO Jr., J.G. 1983. Feeding responses of the Horsefly *Tabanus nigrovittatus* to phagostimulants. **Physio. Entomo.** **8(4)**: 377-383.
- FUENZALIDA, A.D., QUINTANA, M.G., SALOMON, O.D. & GROSSO, M.S. 2011. Hourly activity of *Lutzomyia neivai* in the endemic zone of cutaneous leishmaniasis in Tucumán, Argentina: preliminary results. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **106(5)**: 635-638.
- GALATI, E.A. 2003. Morfologia e taxonomia: Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Eds.). **Flebotomíneos do Brasil**, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 23-51.
- GALATI, E.A., NUNES, V.L., DORVAL, M.E., OSHIRO, T.E., CRISTALDO, G., ESPÍNDOLA, M.A., ROCHA H.C. & GARCIA, W.B. 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera:Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **30(2)**: 115-28.
- GALATI, E.A., NUNES, V.L., REGO JÚNIOR, F.A., OSHIRO, E.T. & CHANG, M.R. 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), em foco de leishmaniose visceral, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **31(4)**: 378-390.
- GALATI, E.A., FONSECA, M.B., MARASSÁ, A.M. & BUENO, E.F. 2009. Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **104(8)**: 1148-1158.

- GALATI, E.A., MARASSÁ, A.M., GONÇALVES-ANDRADE, R.M., BUENO, E.F., PAIVA, B.R. & MALAFRONTTE, R.S. 2010. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) and *Nyssomyia neivai* (Pinto) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in a sympatric area: seasonal and nocturnal hourly rhythm in black and white modified Shannon traps. **Rev. Bras. Entomol.** **54(4)**: 677-686.
- GALATI, E.A., MARASSÁ, A.M., FONSECA, M.B., GONÇALVES-ANDRADE, R.M., CONSALES, C.A. & BUENO, E.F. 2010a. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 3. Serra district - area of hostels for tourists who visit the Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), state of São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Entomol.** **54(4)**: 665-676.
- GOMES, A.C. 1992. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **An. Bras. Derm.** **67(2)**: 55-60.
- GOMES, A.C. 1994. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **89**: 457-460.
- GOMES, A.C., RABELLO, E.X., SANTOS, J.L. & GALATI, E.A. 1980. Aspectos da leishmaniose tegumentar americana. Estudo experimental da frequência de flebotomíneos a ecótopos artificiais com referência à *Psychodopygus intermedius*. **Rev. Saúde Públ.** **14(4)**: 540-556.
- GOMES, A.C, RABELLO, E.X., SANTOS, J.F. & GALATI, E.A. 1983. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extra-florestal. **Rev. Saúde Públ.** **17(1)**: 23-30.
- GOMES, A.C, RABELLO, E.X., SANTOS, J.F. & GALATI, E.A. 1986. Ecological aspects of american cutaneous leishmaniasis. 4. Observation on the endophilic behavior of the sandfly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of the São Paulo State, Brazil. **Rev. Saúde Públ.** **20(4)**: 280-287.

- GOMES, A.C. & GALATI, E.A. 1989. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7. Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente de floresta primário do Sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **23(2)**: 136-142.
- GOMES, A.C., COUTINHO, S.G., PAIM, G.V., OLIVEIRA, S.M., GALATI, E.A., NUNES, M.P., CAPINZAIKI, A.N., YAMAMOTO, Y.I. & ROTTER, P. 1990. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8. Avaliação da atividade enzoótica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.** **32(2)**: 105-115.
- GOMES, A.C. & NEVES, V.L. 1998. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **31(6)**: 553-558.
- GONÇALVES, A.L. 2010. *Aspectos epidemiológico e molecular de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com ênfase ao Complexo Lutzomyia intermedia (Lutz & Neiva, 1912), na região do Vale do Ribeira, área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana, Estado do Paraná, Brasil*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010, 98p.
- GONTIJO, C.M., Da SILVA, E.S., De FUCCIO, M.B., De SOUZA, M.C., PACHECO, R.S., DIAS, E.S., ANDRADE FILHO, J.D., BRAZIL, R.P. & MELO, M.N. 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Trop.** **81(2)**: 143-150.
- GONZÁLEZ, R., DE SOUZA, L., DEVERA, R., JORQUERA, A. & LEDEZMA, E. 1999. Seasonal and nocturnal domiciliary human landing/biting behaviour of *Lutzomyia (Lutzomyia) evansi* and *Lutzomyia (Psychodopygus) panamensis* (Diptera; Psychodidae) in a periurban area of a city on the Caribbean coast of eastern Venezuela (Barcelona; Anzoátegui State). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **93(4)**: 361-364.



- GRIMALDI Jr., G., DAVID, J.R. & McMAHON-PRATT, D. 1987. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **36(2)**: 270-287.
- GRIMALDI Jr. G., TESH, R.B. & McMAHON-PRATT, D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **41(6)**: 687–725.
- GRIMALDI Jr., G. & TESH, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.** **6(3)**: 230-250.
- GUERIN, P.J., OLLIARO, P., SUNDAR, S., BOELAERT, M., CROFT, S.L., DESJEUX, P., WASUNNA, M.K. & BRYCESON, A.D. 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect. Dis.** **2(8)**: 494-501.
- HASHIGUCHI, Y., MIMORI, T. & KAWABATA, M. 1985. Biting activity of two anthropophilic species of sandflies, *Lutzomyia*, in an endemic area of leishmaniasis in Ecuador. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **79(5)**: 533-538.
- HERRER, A., CHRISTENSEN, H.A. & BEUMER, R.J. 1973. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **22(5)**: 585-591.
- HERWALDT, B.L. 1999. Leishmaniasis. **Lancet** **354(9185)**: 1191-1199.
- HIDE, M., BUCHETON, B., KAMHAWI, S., BRAS-GONÇALVES, R., SUNDAR, S., LEMESTRE, J.L. & BAÑULS, A.L. 2007. Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. In: Tibayrenc, M. (Ed.). **Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies**, John Wiley & Sons Inc, New York, pp. 87-123.
- HOCH, A., RYAN, I., VEXENAT, J.A., ROSA, A.C. & BARRETO, A.C. 1986. Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids

from Phlebotomine in a mucocutaneous leishmaniasis endemic area, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **81**: 62.

IAPAR, Instituto Agronômico do Estado do Paraná. 1994. **Cartas Climáticas do Estado do Paraná**, IAPAR, Londrina.

IPARDES, Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. 2014. Cadernos municipais [Internet]. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/>. Acesso em: 29/07/2014.

KATO, H., CALVOPIÑA, M., CRIOLLO, H. & HASHIGUCHI, Y. 2013. First human cases of *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. **Acta Trop.** **128(3)**: 710-713.

KILLICK-KENDRIK, R. 1979. The Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: Lumsden, W.H. & Evans, D.A. (Eds.). **Biology of the Kinetoplastida**, vol. 2. Academic Press, London, pp. 395-460.

KILLICK-KENDRIK, R. 1990. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. **Med. Vet. Entomol.** **4(1)**: 1-24.

KILLICK-KENDRIK, R. 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clin. Dermatol.** **17(3)**: 279-289.

LAINSON, R. 1983. The american leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **77(5)**: 569-596.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1968. Leishmaniasis in Brazil. I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis-incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **62(3)**: 385-395.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1972. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **Brit. Med. Bull.** **28(1)**: 44-48.

LAINSON, R., SHAW, J.J., WARD, R.D. & FRAIHA, H. 1973. Leishmaniasis in Brazil: IX. Considerations of the *Leishmania braziliensis* complex: Importance of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission

- of *L. braziliensis braziliensis* in North Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **67(2)**: 184-196.
- LAINSON, R., WARD R.D. & SHAW, J.J. 1976. Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **70(2)**: 171-172.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1979. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden, W.H. & Evans, D.A. (Eds.). **Biology of the Kinetoplastida**, vol. 2. Academic Press, London, pp. 1-116.
- LAINSON, R., SHAW, J.J., WARD, R.D., READY, P.D. & NAIFF, R.D. 1979. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **73(2)**: 239-242.
- LAINSON, R., SHAW, J.J., READY P.D., MILLES, M.A. & POVOA M. 1981. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **75(4)**: 530-536.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W. & Killick-Kendrick, R. (Eds.). **The Leishmaniases in Biology and Medicine**, vol. 1. Academic Press, London, pp. 1-120.
- LAINSON, R. BRAGA, R.R., SOUZA, A.A., POVOA, M.M., ISHIKAWA, E.A. & SILVEIRA, F.T. 1989. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** **64(3)**: 200-207.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1990. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw 1989. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** **65(5-6)**: 282-284.

- LAINSON, R., SHAW, J.J., SILVEIRA F.T., SOUZA, A.A., BRAGA, R.R. & ISHIKAWA, E.A. 1994. The dermal Leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazônia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **89(3)**: 435-443.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1998. New World leishmaniasis. The Neotropical *Leishmania* species. In: Collier, L., Balows, A. & Sussman, M. (Eds.). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases**, 9<sup>a</sup>. ed., vol. 5. Arnold, London, pp. 241-266.
- LEGRIFFON, C.M., REINHOLD-CASTRO, K.R., FENELON, V.C., NEITZKE-ABREU, H.C. & TEODORO, U. 2012. Sandfly frequency in a clean and well-organized rural environment in the State of Paraná, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **45(1)**: 77-82.
- LEMOS, J.C. & LIMA, S.C. 2005. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos em área de transmissão no Município de Uberlândia, MG. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **38(1)**: 22-26.
- LONARDONI, M.V., SILVEIRA, T.G., ALVES, W.A., MAIA-ELKHOURY, A.N., MEMBRIVE, U.A., MEMBRIVE, N.A., RODRIGUES, G., REIS, N., ZANZARINI, P.D., ISHIKAWA, E. & TEODORO, U. 2006. Leishmaniose tegumentar americana humana e canina no Município de Mariluz, Estado do Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública** **22(12)**: 2713-2716.
- LUTZ, A. & NEIVA, A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **4**: 82-95.
- LUZ, E., MEMBRIVE, N., CASTRO, E.A., DEREURE, J., PRATLONG, F., DEDET, J.A., PANDEY, A. & THOMAZ-SOCCOL, V. 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **94(6)**: 623-631.
- MAACK, R. 2002. **Geografia Física do Estado do Paraná**, 3<sup>a</sup>. ed., Imprensa Oficial, Curitiba.

- MAIA-ELKHOURY, A.N., ALVES, W.A., SOUSA-GOMES, M.L., SENA, J.M. & LUNA, E.A. 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública** **24(12)**: 2941-2947.
- MANGABEIRA, O. 1969. Sobre a sistemática e biologia dos flebótomos do Ceará. **Rev. Bras. Mal. Doen. Trop.** **21**: 3–26.
- MARCELINO, A.P., FERREIRA, E.C., AVENDANHA, J.S., COSTA, C.F., CHIARELLI, D., ALMEIDA, G., MOREIRA, E.C., LEITE, R.C., dos REIS, J.K. & GONTIJO, C.M. 2011. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.** **29(1-2)**: 54-58.
- MARCILI, A., SPERANÇA, M.A., DA COSTA, A.P., MADEIRA, M.D., SOARES, H.S., SANCHES, C.D., ACOSTA, I.D., GIROTTI, A., MINERVINO, A.H., HORTA, M.C., SHAW, J.J. & GENNARI, S.M. 2014. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (*L. infantum chagasi* in South America. **Infect. Genet. Evol.** **25(2014)**: 44-51.
- MARCONDES, C.B. 1996. A redescription of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **91(4)**: 457-462.
- MARCONDES, C.B. 1997. Morfometria e DNA mitocondrial de populações sul americanas de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **30(6)**: 533-534.
- MARCONDES, C.B., DAY, J.C. & READY, A.L. 1997. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *L. neivai* and *L. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania brasiliensis*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **91**: 725-726.
- MARCUSSI, L.M., SKRABA, C.M., PERLES, T.F., PEDROSO, R.B., LONARDONI, M.V. & SILVEIRA, T.G. 2013. Evaluation of specific primers

- for species identification of *Leishmania (V.) braziliensis*. **Rev. Patol. Trop.** **42(1)**: 64-71.
- MARTINS, A.V., WILLIAMS, P. & FALCÃO, A.L. 1978. **American Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**, Acad. Bras. Ciências, Rio de Janeiro.
- MARTINS, L.M., REBÊLO, J.M., SANTOS, M.C., COSTA, J.M., SILVA, A.R. & FERREIRA, L.A. 2004. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. **Cad. Saúde Pública** **20(3)**: 735-743.
- MASSAFERA, R., SILVA, A.M., CARVALHO, A.P., SANTOS, D.R., GALATI, E.A. & TEODORO, U. 2005. Fauna de flebotomíneos do município de Bandeirantes, no Estado do Paraná. **Rev. Saúde Públ.** **39(4)**: 571-577.
- MAYRINK, W., WILLIAMS, P., COELHO, M.V., DIAS, M., MARTINS, A.V., MAGALHÃES, P.A., Da COSTA, C.A., FALCÃO, A.R., MELO, M.N. & FALCÃO, A.L. 1979. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **73(2)**: 123-137.
- MAZZONI, C.J., SOUZA, N.A., ANDRADE-COELHO, C., KYRIACOU, C.P. & PEIXOTO, A.A. 2006. Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the *period* gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. **BMC Evol. Biol.** **6(85)**: 1-11.
- MAZZONI, C.J., ARAKI, A.S., FERREIRA, G.E., AZEVEDO, R.V., BARBUJANI, G. & PEIXOTO, A.A. 2008. Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. **BMC Evol. Biol.** **8**: 141.
- MELO, S.C., CELLA, W., MASSAFERA, R., SILVA, N.M., MARQUI, R., CARVALHO, M.D. & TEODORO, U. 2013. Phlebotomine sandflies in rural locations in the state of Parana, southern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **55(6)**: 407-410.
- MEMBRIVE, N.A., RODRIGUES, G., MEMBRIVE, U., MONTEIRO, W.M., NEITZKE, H.C., LONARDONI, M.V., SILVEIRA, T.G. & TEODORO, U.

2004. Flebotomíneos de municípios do norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Entomol. Vect.** **11(4)**: 673-680.
- MENESES, C.R., AZEVEDO A.C., COSTA, S.M., COSTA, W.A. & RANGEL, E.F. 2002. Ecology of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Vector Ecol.** **27**: 207-214.
- MENESES, C.R., CUPOLILLO, E., MONTEIRO, F. & RANGEL, E.F. 2005. Micro-geographical variation among male populations of the sandfly, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, from an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Med. Vet. Entomol.** **19(1)**: 38–47.
- MICHALSKY, E.M., FRANÇA-SILVA, J.C., BARATA, R.A., SILVA, F.O., LOUREIRO, A.M., FORTES-DIAS, C.L., DIAS, E.S. 2009. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **104(1)**: 56–61.
- MIRANDA, R.N. & SCHWEIDSON, J. 1955. A Leishmaniose Tegumentar no Paraná. **Rev. Méd. do Paraná** **24**: 5-6.
- MORRISON, A.M., FERRO, C., PARDO, R., TORRES, M., WILSON, M.L. & TESH, R.B. 1995. Nocturnal Activity Patterns of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia. **J. Med. Entomol.** **32(5)**: 605-617.
- MOSCHIN, J.C., OVALLOS, F.G., SEI, I.A. & GALATI, E.A. 2013. Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Epidemiol.** **16(1)**: 190-201.
- NAIFF, R.D., FREITAS, R.A., NAIFF, M.F., ARIAS, J.R., BARRETT, T.V., MOMEN, H. & GRIMALDI Jr., G. 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **86(3)**: 317-321.
- NASCIMENTO, T.F., ROSA-FREITAS, M.G., MOTTA, M.A., BARBOSA, A.F., SOUZA, N.A., VILELLA, M.L., QUEIROZ, M.M., MALLETT, J.R., MACEDO,

- C.L. & GONÇALVES, T.C. 2012. Entomologia Médica. In: Molinaro, E.M., Caputo, L.F. & Amendoeira, M.R. (Eds.). **Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde: Volume 5**, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pp. 283-412.
- NEITZKE-ABREU, H.C., SANTOS, D.R., SILVA, A.M., REINHOLD-CASTRO, K.R., LONARDONI, M.V. & TEODORO, U. 2012. Alteration in frequency of sand flies in domiciles after changes in the peridomicile area, State of Paraná, Brazil. **J. Vector Ecol.** **37(2)**: 466-470.
- NERY-GUIMARÃES, F. 1955. Estudo de um foco de leishmaniose mucocutânea na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **53**: 1-11.
- ODDONE, R., SCHWEYNOCH, C., SCHÖNIAN, G., SOUSA, C.S., CUPOLILLO, E., ESPINOSA, D., AREVALDO, J., NOYES, H., MAURICIO, I. & KUHL, K. 2009. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (*Viannia*) species. **J. Clin. Microbiol.** **47(9)**: 2818-2825.
- ODORIZZI, R.M. & GALATI, E.A. 2007. Flebotomíneos de várzea do rio Aguapeí, região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **41(4)**: 645-652.
- OLIVEIRA, C.L., ASSUNÇÃO, R.M., REIS, I.A. & PROIETTI, F.A. 2001. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cad. Saúde Pública** **17(5)**: 1231-1239.
- OLIVEIRA, A.G., GALATI, E.A., FERNANDES, C.E., DORVAL, M.E. & BRAZIL, R.P. 2008. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Trop.** **105(1)**: 55-61.



- OLIVEIRA, F., JOCHIM, R.C., VALENZUELA, J.G. & KAMHAWI, S. 2009. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. **Parasitol. Int.** **58(1)**: 1-5.
- OLIVEIRA-NETO, M.P., PIRMEZ, C., RANGEL, E., SCHUBACH, A., & GRIMALDI Jr., G. 1988. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of Rio de Janeiro: clinical and epidemiological. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **83(4)**: 427–435.
- PASSOS, V.M., FALCÃO, A.L., MARZOCHI, M.C., GONTIJO, C.M., DIAS, E.S., BARBOSA-SANTOS, E.G., GUERRA, H.L. & KATZ, N. 1993. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **88(1)**: 103-110.
- PAVLOVSKY, E.N. 1965. **Natural Nidality of Transmissible Diseases**, Peace Publishers, Moscow.
- PEREIRA, I.R. & HOCH, A. 1990. *Lutzomyia intermedia* as a suspected vector of *Leishmania Viannia braziliensis* in Bahia State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **23(4)**: 235.
- PESSÔA, S.B. & BARRETO, M.P. 1948. **Leishmaniose Tegumentar Americana**, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.
- PESSÔA, S.B. & COUTINHO, J.O. 1941. Infecção natural e experimental dos flebótomos por *Leishmania braziliensis*, no Estado de São Paulo. **O Hospital** **20**: 25-35.
- PESSÔA, S.B. & COUTINHO, J.O. 1941a. Infecção natural de *Phlebotomus pessoai* por formas em leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. **Rev. Biol. Hig.** **10**: 139-142.
- PESSÔA, S.B. & PESTANA B.R. 1940. Infecção natural do “*Flebotomus migonei*” por formas leptomonas, provavelmente da “*Leishmania braziliensis*”. **Acta Medica**: 106-111.

- PETERSON, A.T. & SHAW, J. 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **Int. J. Parasitol.** **33(9)**: 919–931.
- PITA-PEREIRA, D., ALVES, C.R., SOUZA, M.B., BRAZIL, R.P., BERTHO, A.L., BARBOSA, A.F. & BRITTO, C.C. 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** **99(12)**: 905-913.
- PITA-PEREIRA, D., SOUZA, G.D., ZWETSCH, A., ALVES, C.R., BRITTO, C. & RANGEL, E.F. 2009. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **80(4)**: 593-595.
- PITA-PEREIRA, D., SOUZA, G.D., PEREIRA, T.A., ZWETSCH, A. & RANGEL, E.F. 2011. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta Trop.** **120(3)**: 273– 275.
- QUEIROZ, R.G., VASCONCELOS, L.A., VASCONCELOS, A.W., PESSOA F.A., SOUZA, R.N. & DAVID, J.R. 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **50(6)**: 693-698.
- QUINNELL, R.J. & DYE, C. 1994. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. **Med. Vet. Entomol.** **8(3)**: 219–224.

- RANGEL, E.F. 1995. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. In: **Tropical Diseases, Society and the Environment**, Technical Report., Stockholm, pp. 103-110.
- RANGEL, E.F., SOUZA, N.A., WERMELINGER, E.D. & BARBOSA, A.F. 1984. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **79(3)**: 395-396.
- RANGEL, E.F., SOUZA, N.A., WERMELINGER, E.D. & BARBOSA, A.F. 1985. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **80(2)**: 219-226.
- RANGEL, E.F., SOUZA, N.A., WERMELINGER, E.D., AZEVEDO, A.C., BARBOSA, A.F. & ANDRADE, C.A. 1986. Flebotomíneos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **81**: 347-349.
- RANGEL, E.F., AZEVEDO, A.C., ANDRADE, C.A., SOUZA, N.A. & WERMELINGER, E.D. 1990. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **85(1)**: 39-45.
- RANGEL, E.F., BARBOSA, A.F., ANDRADE, C.A., SOUZA, N.A. & WERMELINGER, E.D. 1992. Development of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **87(2)**: 235-238.
- RANGEL, E.F., TRAVI, B.L., BARBOSA, A.F. & MONTOYA, J. 1993. Development of Colombian isolates of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*, *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis* in the sandfly *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) under experimental conditions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **88(4)**: 513-515.

- RANGEL, E.F. & LAINSON, R. 2003. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Eds.). **Flebotomíneos do Brasil**, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 291-309.
- RANGEL, E.F. & VILELA, M.L. 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública** **24**(12): 2948-2952.
- RANGEL, E.F. & LAINSON, R. 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **104**(7): 937-954.
- READY, P.D. 2011. Should sandfly taxonomy predict vectorial and ecological traits? **J. Vector Ecol.** **36**(1): S17–22.
- READY, P.D. 2013. Biology of Phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annu. Rev. Entomol.** **58**: 227–250.
- REINHOLD-CASTRO, K.R., SCODRO, R.B., DIAS-SVERSUTTI, A.C., NEITZKE, H.C., ROSSI, R.M., KUHLE, J.B., SILVEIRA, T.G. & TEODORO, U. 2008. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **41**(3): 269-276.
- REITHINGER, R., DUJARDIN, J.C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B. & BROOKER, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** **7**(9): 581-596.
- ROCHA, L.S., FALQUETO, A., SANTOS, C.B., GRIMALDI Jr., G. & CUPOLILLO, E. 2007. Genetic structure of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* populations from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* reflects distinct eco-epidemiologic features. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **76**(3): 559-565.
- ROCHA, L.S., SANTOS, C.B., FALQUETO, A., GRIMALDI Jr., G. & CUPOLILLO, E. 2010. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. **Parasitol. Res.** **107**(2): 465-468.

- RODRIGUES, A.C., DOS SANTOS, A.B., FEITOSA, L.F., SANTANA, C.S., NASCIMENTO, E.G., MOREIRA Jr., E.D. 1999. Criação peridomiciliar de galináceos aumenta o risco de leishmaniose visceral humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **32**: 12-13.
- RODRIGUES, A.A., BARBOSA, V.A., ANDRADE FILHO, J.D. & BRAZIL, R.P. 2013. The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **108(7)**: 943-946.
- ROGERS, M.E., ILG, T., NIKOLAEV, A.V., FERGUSON, M.A. & BATES, P.A. 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature** **430(6998)**: 463-467.
- ROQUE, A.L. & JANSEN, A.M. 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** **3(2014)**: 251–262.
- RYAN, L., LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1987. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the rôle of *Psychodopygus welcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajás. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **81(3)**: 353-359.
- RYAN, L., VEXENAT, A., MARSDEN P.D., LAINSON, R. & SHAW, JJ. 1990. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sand fly vector. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **84(6)**: 786.
- SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.** **2(11)**: 845-858.
- SANTOS, S.O., ARIAS, J., RIBEIRO, A.A., HOFFMANN, M.P., FREITAS, R.A. & MALACCO, M.A. 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.** **12(3)**: 315-317.

- SANTOS, D.R., SANTOS, A.R., POIANI, L.P., OLIVEIRA, O., SILVA, A.M. & GALATI, E.A. 2009. Ocorrência de *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) (Diptera:Psychodidae) e fauna associada, no Paraná. **Neotrop. Entomol.** **38(2)**: 298-301.
- SANTOS, D.R., FERREIRA, A.C. & BISETTO Jr., A. 2012. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **45(5)**: 643-645.
- SARAIVA, L., LOPES, J.S., OLIVEIRA, G.B., BATISTA, F.A., FALCÃO, A.L. & ANDRADE FILHO, J.D. 2006. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **39(1)**: 56-63.
- SEVÁ FILHO, A.O. & KALINOWSKI, L.M. 2012. Transposição e hidrelétricas: o desconhecido Vale do Ribeira (PR-SP). **Estud. Av.** **26(74)**: 269-286.
- SHANNON, R. 1939. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** **19**: 131-148.
- SHAW, J.J. 2002. New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: Farrell, J.P. (Ed.). **World Class Parasites: Leishmania**, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 11-31.
- SHAW, J.J. & LAINSON, R. 1987. Ecology and epidemiology: New World. In: Peters, W. & Killick-Kendrick, R. (Eds.). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, vol. 1. Academic Press, London, pp. 291–363.
- SHAW, J.J., LAINSON, R., RYAN, L., BRAGA, R.R., McMAHON-PRATT, D. & DAVID, JR. 1987. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught Neotropical sandflies using monoclonal antibodies. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **81(1)**: 69-72.
- SHAW, J.J., ROSA, A.T., SOUZA, A. & CRUZ, A.C. 2003. Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In:

- Rangel, E.F. & Lainson, R. (Eds.). **Flebotomíneos do Brasil**, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 337-351.
- SHERLOCK, I.A. 1997. Há especificidade dos flebotomíneos para as leishmânias? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **30(1)**: 151-155.
- SILVA, A.C. & GOMES, A.C. 2001. Estudo da Competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **34(2)**: 187-191.
- SILVA, A.M., CAMARGO, N.J., SANTOS, D.R., MASSAFERA, R., FERREIRA, A.C., POSTAI, C., CRISTÓVÃO, E.C., KONOLSAISEN, J.F., BISELTO Jr., A., PERINAZO, R., TEODORO, U. & GALATI, E.A. 2008. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) no Paraná. **Neotrop. Entomol.** **37(2)**: 209-225.
- SILVEIRA, F.T., LAINSON, R., SHAW, J.J. & PÓVOA, M.M. 1982. Leishmaniasis in Brazil. XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral Leishmaniasis. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** **76(6)**: 830-832.
- SILVEIRA, F.T., SOUZA, A.A., LAINSON, R., SHAW, J.J., BRAGA, R.R. & ISHIKAWA, E.A. 1991. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: Natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **86(1)**: 127-130.
- SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A., de SOUZA, A.A. & LAINSON, R. 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite** **9(1)**: 43-50.
- SILVEIRA, F.T., LAINSON, R. & CORBETT, C.E. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **99(3)**: 239-251.

- SOARES, R.P. & TURCO, S.J. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An. Acad. Bras. Cienc.** **75(3)**: 1-30.
- SOUZA, N.A. 1993. *Influência de várias fontes de carboidratos na biologia de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1993, 100p.
- SOUZA, N.A. 2003. *Aspectos da Ecologia de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) No Distrito de Posse, Área de Ocorrência da Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro*. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz, 2003, 100p.
- SOUZA, N.A., ANDRADE-COELHO, C.A., BARBOSA, A.F., VILELA, M.L., RANGEL, E.F. & DEANE, M.P. 1995. The influence of sugars and amino acids on the blood-feeding behaviour, oviposition and longevity of laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **90(6)**: 751-757.
- SOUZA, A., ISHIKAWA, E., BRAGA, R., SILVEIRA, F., LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1996. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **90(2)**: 112-113.
- SOUZA, N.A., ANDRADE-COELHO, C.A., VILELA, M.L. & RANGEL, E.F. 2001. The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two atlantic rain forest reserves in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **96(3)**: 319-324.
- SOUZA, N.A., ANDRADE-COELHO, C.A., VILELA, M.L., PEIXOTO, A.A. & RANGEL, E.F. 2002. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **97(6)**: 759-765.



- SOUZA, N.A., ANDRADE-COELHO, C.A., PEIXOTO, A.A. & RANGEL, E.F. 2005. Nocturnal activity rhythms of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of american cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. **J. Med. Entomol.** **42(6)**: 986-992.
- SOUZA, G.D., SANTOS, E. & ANDRADE-FILHO, J.D. 2009. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **104(8)**:1181-1182.
- STIERHOF, Y.D., BATES, P.A., JACOBSON, R.L., ROGERS, M.E., SCHLEIN, Y., HANDMAN, E. & ILG, T. 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. **Eur. J. Cell Biol.** **78(10)**: 675-689.
- SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. 2005. Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande de São Paulo. **Rev. Saúde Públ.** **(39)1**: 137-138.
- SUDIA, W.D. & CHAMBERLAIN, R.W. 1962. Battery-operated light trap, an improved model. **Mosq. News** **22**: 126-129.
- SVOBODOVÁ, M., ALTEN, B., ZÍDKOVÁ, L., DVORÁK., V., HLAVACKOVÁ, J., MYSKOVÁ, J., SEBLOVÁ, V., KASAP, O.E., BELEN, A., VOTÝPKA, J. & VOLF, P. 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. **Int. J. Parasitol.** **39(2)**: 251-256.
- TANIGUCHI H.H., TOLEZANO J.E., CORREA, F.M., MORAES, R.H., VEIGA R.M. & MARASSÁ, A.M. 1991. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. I. Composição da fauna flebotomínica no Município de São Roque, Região de Sorocaba. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** **51(1/2)**: 23-30.

- TEODORO, U., SALVIA FILHO, V.L., LIMA, E.M., MISUTA, N.M., VERGINASSI, T.G. & FERREIRA, M.E. 1991. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no Norte do Paraná - Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **25(2)**: 129-133.
- TEODORO, U., SALVIA FILHO, V.L., LIMA, E.M., SPINOSA, R.P., BARBOSA, O.C., FERREIRA, M.E. & SILVEIRA, T.G. 1993. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado do Paraná - Brasil: variação sazonal e atividade noturna. **Rev. Saúde Públ.** **27(3)**: 190-194.
- TEODORO, U., SALVIA FILHO, V.L., LIMA, E.M., SPINOSA, R.P., BARBOSA, O.C., FERREIRA, M.E. & LONARDONI, M.V. 1993a. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **27(4)**: 242-249.
- TEODORO, U. & KUHL, J.B. 1997. Interação flebotomíneos, animais domésticos e dominância de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área com alto grau de antropia, no Sul do Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **31(5)**: 512-516.
- TEODORO, U., KUHL, J.B., SANTOS, D.R. & SANTOS, E.S. 1999. Impacto de alterações ambientais na ecologia de flebotomíneos no sul do Brasil. **Cad. Saúde Pública** **15(4)**: 901-906.
- TEODORO, U., SILVEIRA, T.G., SANTOS, D.R., SANTOS, E.S., SANTOS, A.R., OLIVEIRA, O. & KUHL, J.B. 2001. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo - Estado do Paraná - Brasil. **Rev. Patol. Trop.** **30(2)**: 209-223.
- TEODORO, U., ALBERTON, D., KUHL, J.B., SANTOS, E.S., SANTOS, D.R., SANTOS, A.R., OLIVEIRA, O., SILVEIRA, T.G. & LONARDONI, M.V. 2003. Ecologia de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* em área urbana do município de Maringá, Paraná. **Rev. Saúde Públ.** **37(5)**: 651-656.

- TEODORO, U., SANTOS, D.R., SANTOS, A.R., OLIVEIRA, O., POIANI, L.P., SILVA, A.M., NEITZKE, H.C., MONTEIRO, W.M., LONARDONI, M.V. & SILVEIRA, T.G. 2006. Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. **Rev. Saúde Públ.** **40(2)**: 327-330.
- TEODORO, U., LONARDONI, M.V., SILVEIRA, T.G., DIAS, A.C., ABBAS, M., ALBERTON, D. & SANTOS, D.R. 2007. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **41(3)**: 383-388.
- TEODORO, U., KUHL, J.B. & SANCHES, L.A. 2011. Frequência de flebotomíneos em localidades rurais do município de Prudentópolis, Estado do Paraná, Brasil. **Rev. Patol. Trop.** **40(2)**: 169-177.
- THOMAZ-SOCCOL, V. 1993. *Les Leishmania du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Démarche progressive phénétique-cladistique. Relations phylogénétiques avec les Leishmania de l'Ancien Monde*. These de doctorat, Faculté de Médecine, Montpellier, France, 1993, 190p.
- THOMAZ-SOCCOL, V., LANOTTE, G., RIOUX, J.A., PRATLONG, F., MARTINI-DUMAS, A. & SERRES, E. 1993a. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** **68(2)**: 107-108.
- THOMAZ-SOCCOL, V., LANOTTE, G., RIOUX, J.A., PRATLONG, F., MARTINI-DUMAS, A. & SERRES, E. 1993b. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** **68(2)**: 104-106.
- THOMAZ-SOCCOL, V., VELEZ, I.D., PRATLONG, F., AGUDELOS, S., LANOTTE, G. & RIOUX, J.A. 2000. Enzymatic polymorphism and phylogenetic relationships in *Leishmania* Ross, 1903 (Sarcosomastigophora: Kinetoplastida): a case study in Colombia. **Syst. Parasitol.** **46(1)**: 59-68.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A., SCHNELL E SCHUHLLI, G., CARVALHO, Y., MARQUES, E., PEREIRA, E.F., ALCÂNTARA, F.S., MACHADO, A.M., KOWALTHUK, W., MEMBRIVE, N. & LUZ, E. 2009. A

- new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Paraná State, southern Brazil. **Acta Trop.** **111(3)**: 308-315.
- TITUS, R.G., THEODOS, C.M., SHANKAR, A. & HALL, L.R. 1993. Interactions between *Leishmania major* and macrophages. In: Zwillig, T. & Eisenstein, T. (Eds.). **Macrophage-Pathogen Interactions**, Marcel Dekker, New York, pp. 437–459.
- TOLEZANO, J.E. 1994. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **89(3)**: 427–434.
- TOLEZANO, J.E., TANIGUCHI, H.H., ELIAS, C.R. & LAROSA, R. 2001. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** **60(1)**: 47-51.
- TRAVI, B.L., VÉLEZ, I.D., BRUTUS, L., SEGURA, I., JARAMILLO, C. & MONTOYA, J. 1990. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in Colombian focus of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **84(5)**: 676-677.
- ULIANA, S.R. 2012. *Leishmania* e leishmanioses. In: Ferreira, M.U. **Parasitologia Contemporânea**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 47-56.
- VIEIRA, V., FERREIRA, A.L. & FALQUETO, A. 1999. Pesquisa de criadouros de flebotomíneos no ambiente peridomiciliar, em área endêmica de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **32(1)**: 31–32.
- VIRGENS, T.M., SANTOS, C.B., PINTO, I.S., SILVA, K.S., LEAL, F.C. & FALQUETO, A. 2008. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo State, Brazil. **Cad. Saúde Pública** **24(12)**: 2969-2978.
- VOLPINI, A.C., PASSOS, V.M., OLIVEIRA, G.C. & ROMANHA, A.J. 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania)*

- amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.** **90(1)**: 31-37.
- WATERHOUSE, D.F. 1957. Digestion in insects. **Annu. Rev. Entomol.** **2**: 1-18.
- WERNECK, G.L. 2008. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cad. Saúde Pública** **24(12)**: 2937-2940.
- WHO, World Health Organization. 2014. Leishmaniasis. [Internet]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 19/10/2014.
- WILLIAMS, P. 1966. The biting rhythms of some antropophilic Phlebotominae sand flies in British Honduras. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **60**: 357-364.
- WILLIAMS, P. 1970. Phlebotomine sandflies and leishmaniasis in British Honduras (Belize). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **64(3)**: 317-364.
- WILLIAMS, P. & COELHO, M.V. 1978. Taxonomy and transmission of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.** **16**: 1-42.
- YOUNG, D.G. & DUNCAN, M.A. 1994. Guide to the identification and geographical distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem. Am. Entom. Inst.** **54**: 1-881.